
Arzneimittelresistenz-assoziierte, protozoische Membranproteine:

Untersuchungen zur Struktur und Inhibitorfindung des plasmodialen
Chloroquin-Resistenz-Transporters sowie zum Pentamidin-
Aufnahmemechanismus über das trypanosomale Aquaglyceroporin 2

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Lea Madlen Petersen

Kiel, 2021

Erster Gutachter:	Professor Dr. Eric Beitz
Zweite Gutachterin:	Professorin Dr. Birgit Classen
Tag der mündlichen Prüfung:	31.05.2021

“Was aber ist ein Ozean anderes als eine Vielzahl von Tropfen?”

David Mitchell, *Der Wolkenatlas*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Protozoische, vektorübertragene Infektionen.....	1
1.2 Resistenzmechanismen eukaryotischer Mikroorganismen	4
1.3 Resistenzmechanismen von <i>P. falciparum</i> und PfCRT.....	6
1.4 Resistenzmechanismen von <i>T. brucei</i> und TbAQP2.....	17
1.5 Zielsetzung.....	21
2 Material	22
2.1 Plasmide, kodierende DNA, Oligonukleotide und Zellstämme	22
2.2 Antikörper, Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.3 Nährmedien, Lösungen & Puffer	29
2.4 Geräte & Software.....	34
3 Methoden	37
3.1 Molekularbiologische Methoden	37
3.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	37
3.1.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	38
3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und ihre Konzentrationsbestimmung	38
3.1.4 Restriktionsverdau von DNA und Agarosegelelektrophorese	39
3.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen & Reinigung von PCR-Produkten	40
3.1.6 Ligation von DNA	41
3.1.7 Ortsspezifische Mutagenese	41
3.1.8 Sanger-Sequenzierung von DNA	42
3.2 Allgemeine proteinchemische Methoden	42
3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	42
3.2.2 SDS-PAGE, Western Blot und Coomassie®-Färbung von SDS-Gelen	43
3.3 Produktion und Reinigung zellfreier Proteine.....	44
3.3.1 Gewinnung eines S30-Extrakts aus <i>E. coli</i>	45
3.3.2 Zellfreie Proteinproduktion.....	46
3.3.3 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).....	49
3.3.4 Konzentrierung von Proteinproben	50
3.3.5 Größenausschlusschromatographie (SEC)	50
3.4 Untersuchung von rekombinanten Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>	50

3.4.1	Gewinnung der Membranfraktion von <i>S. cerevisiae</i>	50
3.4.2	Protoplastierung von <i>S. cerevisiae</i> & Streulichtmessungen.....	51
3.4.3	Messung der Trübung von Hefekulturen mit dem <i>Bioscreen C</i>	54
3.5	Synthese von Pentamidin-Biotin.....	56
3.6	Viabilitätsbestimmung und Mikroskopie von Trypanosomen.....	58
3.7	Berechnung von IC ₅₀ -Werten	59
3.8	Statistische Auswertung	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Ein zellfreies Produktionssystem zur Strukturaufklärung von PfCRT	61
4.1.1	Das Kernstück der zellfreien Proteinproduktion: Der S30-Ribosomen-Extrakt...61	
4.1.2	Brij® 78 ermöglicht die zellfreie Produktion von PfCRT	63
4.1.3	Affinitätschromatographie: Einfluss von Pufferzusätzen und Detergenzien	66
4.1.4	Größenausschlusschromatographie: Qualität und Stabilität von PfCRT	75
4.1.5	Untersuchungen zu SDS-resistenten Multimeren von zellfreiem PfCRT	80
4.1.6	Versuche zur Strukturaufklärung von zellfreiem PfCRT	83
4.2	Ein phänotypischer Assay zur Findung eines PfCRT-Inhibitors	86
4.2.1	Mutagenese von PfCRT ^{3D7} zu PfCRT ^{Dd2}	87
4.2.2	Phänotypische Charakterisierung von PfCRT-Isoformen in <i>S. cerevisiae</i>	87
4.2.3	Verapamil – Ein Substrat von PfCRT ^{3D7} ?	91
4.2.4	Suche nach PfCRT-Inhibitoren in der Malaria-Box	92
4.3	Untersuchungen zum Pentamidin-Aufnahmemechanismus über TbAQP2	94
4.3.1	Funktionelle Expression von <i>T. brucei</i> Aquaglyceroporinen in <i>S. cerevisiae</i>	95
4.3.2	Einfluss von Ionophoren auf die Funktion von TbAQP2 und TbAQP3	97
4.3.3	Pentamidin-Biotin: Ein für Trypanosomen nicht toxischer TbAQP2-Inhibitor..	103
4.3.4	Pentamidin inhibiert TbAQP2 unmittelbar.....	108
5	Diskussion	110
5.1	Zur Strukturaufklärung von PfCRT	110
5.1.1	Eignet sich zellfreies PfCRT für eine Strukturaufklärung?	110
5.1.2	Kryo-EM: Ein neuer Ansatz für die Strukturaufklärung von PfCRT	116
5.1.3	Zellfreies Protein für Funktionsstudien	118
5.2	Der Phänotyp von PfCRT exprimierenden <i>S. cerevisiae</i> für eine Inhibitorfindung.	119
5.2.1	PfCRT-Isoformen vermitteln einen CQ-Influx in <i>S. cerevisiae</i>	119
5.2.2	Der <i>rescue</i> -Assay detektierte keinen PfCRT-Inhibitor in der Malaria Box	121
5.3	Pentamidin: Substrat oder Inhibitor von TbAQP2?	124
5.3.1	Risiken und Nebenwirkungen von Ionophoren	124
5.3.2	Die Kontroverse um den Pentamidin-Aufnahmemechanismus	126
5.4	Schlussfolgerung.....	129

6	References.....	130
7	Anhang.....	158
7.1	<i>Open reading frame</i> (ORF) der codonoptimierten <i>pfcr1</i> -Sequenz.....	158
7.2	Synthese und Analytik von Pentamidin-Biotin.....	160

Abkürzungsverzeichnis

A

Å	Angström
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
AQP	Aquaporin
ar/R	aromatischer Argininfilter
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>

B

β-OG	<i>n</i> -Octyl-β-D-glucopyranosid
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Gruppe
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>

C

CAU	Christian-Albrechts-Universität
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenyl-hydrazon
CECF	<i>continuous exchange cell-free</i>
CF	<i>cell-free</i>
CHS	Cholesterolemehisuccinat
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
CQ	Chloroquin
CQS	chloroquinsensibel
CQR	chloroquinresistent
CTP	Cytidin-5'-triphosphat

D

δ	chemische Verschiebung
d	Dublett (NMR-Spektroskopie)
dd	Dublett eines Dubletts (NMR-Spektroskopie)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DDM	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltopyranosid
DM	<i>n</i> -Decyl-β-D-maltopyranosid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	<i>drug/metabolite transporter</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-NTP
ddNTP	2',3'-Dideoxy-NTP
DTT	1,4-Dithiothreitol

E

EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ESI	Elektrospray-Ionisation

F

Fab	antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCH-12	Foscholin-12
FM	<i>feeding mixture</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer

G

GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat

H

HA	Hämagglutinin
HAPT1	<i>high affinity pentamidine transporter</i>
HAT	humane afrikanische Trypanosomiasis
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie

I

IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

J

<i>J</i>	Kopplungskonstante
----------	--------------------

K

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

L

λ	Wellenlänge; Lambda-Phage
LB	Luria-Bertani

LDAO	<i>n</i> -Dodecyl- <i>N,N</i> -dimethylamin- <i>N</i> -oxid
LMNG	2,2-Didecylpropan-1,3-bis- β -D-maltopyranosid
M	
m	Multipllett (NMR-Spektroskopie)
MM	Mastermix
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MP	Membranprotein
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MS	Massenspektrometrie
MSP	<i>membrane scaffold protein</i>
MTBST	Magermilchpulver in TBST
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
N	
n	Anzahl (Stichprobe, Messungen)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTD	<i>neglected tropical disease</i>
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
O	
o. D.	ohne Datum
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
P	
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfCRT	Chloroquin-Resistenz-Transporter aus <i>P. falciparum</i>
PfEMP1	Erythrozytäres Membranprotein 1 aus <i>P. falciparum</i>
PfFNT	Formiat-Nitrit-Transproter aus <i>P. falciparum</i>
ppm	<i>parts per million</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Q	
q	Quartett (NMR-Spektroskopie)
R	
RM	<i>reaction mixture</i>
RNA	Ribonukleinsäure
S	
s	Singulett (NMR-Spektroskopie)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>synthetic defined</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SS-DNA	Desoxyribonukleinsäure aus Lachssperma
T	
t	Triplett (NMR-Spektroskopie)
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TbAQP	Aqua(glycero)porin aus <i>T. brucei</i>
TBS	TRIS <i>buffered saline</i>
TBST	TBS mit Tween® 20
TCAMS	<i>Tres Cantos Antimalarial Compound Set</i>
TEM	Transmissionselektronen-mikroskopie
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TM	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-DNA
U	
UTP	Uridin-5'-triphosphat
V	
VBD	<i>vector-borne disease</i>
VP	Verapamil
WHO	<i>world health organization</i>
X	
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Y	
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
YPTG	<i>yeast extract, phosphate, tryptone and glucose</i>

Zusammenfassung

Die Kontrolle der vektorübertragenen Krankheiten Malaria und humanen afrikanischen Trypanosomiasis hängt von der Wirksamkeit der verfügbaren Chemotherapeutika ab. Zwei membranständige Transportproteine der protozoischen Erreger *Plasmodium falciparum* und *Trypanosoma brucei* werden mit Arzneistoffresistenzen in Verbindung gebracht. Insbesondere die Verwendung von Chloroquin als kosteneffizienten antiplasmodialen Arzneistoff mit umfangreicher klinischer Erfahrung ist dadurch eingeschränkt. Der plasmodiale Chloroquin-Resistenz-Transporter (PfCRT) ist eine potenzielle pharmakologische Zielstruktur. Ein Ziel dieser Arbeit war die rekombinante Produktion und Reinigung, um korrekt gefaltetes, reines Protein in großen Mengen einer Strukturaufklärung zugänglich zu machen. Basierend auf einem Ribosomenextrakt aus *Escherichia coli* wurde der Wildtyp PfCRT^{3D7} in einem zellfreien System produziert und mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Durchschnittlich wurden 1,5 mg Protein pro ml des zellfreien Reaktionsansatzes hergestellt. Die Qualität wurde mit Hilfe eines C-terminal fusionierten grün fluoreszierenden Proteins (GFP) als Faltungsindikator und mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bewertet. SDS-resistente Oligomere und TEM-Bilder von in Brij® 78 solubilisiertem PfCRT indizierten eine Dimerisierung, welche für eine zukünftige Strukturaufklärung mittels Kryo-EM von Vorteil sein könnte. Ein weiteres Ziel war die Etablierung eines *target*-basierten Assays zur Inhibitorfindung, wozu PfCRT^{3D7} in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert wurde. Ein Chloroquin-Influx über PfCRT^{3D7} in das Hefezytosol manifestierte sich in einer Wachstumsbeeinträchtigung. Diese wurde in einem turbidimetrischen Assay in einem 100-well-Plattenformat überwacht. In der Malaria-Box (*Medicines for Malaria Venture*) wurde kein Inhibitor von PfCRT^{3D7} gefunden, der das durch 10 mM Chloroquin gestörte Wachstum regenerieren konnte. Die Expression der mit einer Resistenz assoziierten Variante PfCRT^{Dd2} mit acht Mutationen führte zu einer stärkeren Wachstumsbeeinträchtigung. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Hypothese, dass ein mutierter PfCRT die Hauptdeterminante für die Chloroquinresistenz ist. In *T. brucei* wird der Mechanismus der Aufnahme des antitrypanosomalen Arzneistoffs Pentamidin über das Aquaglyceroporin 2 (TbAQP2) kontrovers diskutiert. In diesem Zusammenhang verwendeten einige Studien Ionophore. Diese Arbeit zeigt einen inhibitorischen Effekt von CCCP und Gramicidin auf die Funktion von TbAQP2 und TbAQP3 bei Verwendung eines neutralen Solut bei neutralem pH-Wert. Dies verdeutlicht die Bedeutung geeigneter Kontrollen beim Einsatz von Ionophoren. Des Weiteren sollte der Aufnahmemechanismus mit einem biotin-gekoppelten Pentamidinderivats untersucht werden. Wie Pentamidin verhielt sich dieses als nanomolarer Inhibitor der Glycerolpermeabilität von TbAQP2, welche durch Lichtstreuemessungen von osmotisch empfindlichen *S. cerevisiae* ermittelt wurde. Die Viabilität von Trypanosomen wurde nicht beeinträchtigt. Eine unspezifische Bindung an die Trypanosomenoberfläche behinderte die mikroskopische Überprüfung der vorgeschlagenen rezeptorvermittelten Endozytose.

Abstract

The control of the vector-borne diseases malaria and human African trypanosomiasis depends on the effectiveness of available chemotherapeutic agents. Two membrane transport proteins of the protozoan pathogens *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei* are associated with drug resistance. In particular, the use of chloroquine as a cost-effective anti-plasmodial drug with extensive clinical experience is limited by resistance. Hereof, the plasmodial chloroquine resistance transporter (PfCRT) is a potential drug target. We aimed at a recombinant production and purification to provide properly folded, pure protein in large quantities amenable to structural elucidation. Based on an *Escherichia coli* ribosome extract, wild type PfCRT^{3D7} was produced using a cell-free system and purified by affinity and size exclusion chromatography. An average of 1.5 mg of protein per ml of the cell-free reaction mixture was produced. Quality was assessed by using C-terminally fused green fluorescent protein (GFP) as a folding indicator and by transmission electron microscopy (TEM). SDS-resistant oligomers and TEM images of PfCRT solubilized in Brij® 78 indicated dimerization, which may promote future structural elucidation by cryo-EM. Furthermore, we aimed at establishing a target-based assay for inhibitor discovery by expressing PfCRT^{3D7} in *Saccharomyces cerevisiae*. Chloroquine influx via PfCRT^{3D7} into the yeast cytosol manifested in a growth impairment. This was monitored by a turbidimetric assay in a 100-well plate format. Within the malaria box (Medicines for Malaria Venture), we found no inhibitor of PfCRT^{3D7} that was able to regenerate the impaired yeast growth in the presence of 10 mM chloroquine. The more severe growth impairment by expression of PfCRT^{Dd2} carrying eight mutations is consistent with the hypothesis that a mutant PfCRT is the main determinant for chloroquine resistance. In *T. brucei*, the uptake mechanism of the antitrypanosomal drug pentamidine via the aquaglyceroporin isoform 2 (TbAQP2) is controversially discussed. In this context, some studies based their findings on ionophore dependent effects. This work demonstrates an inhibitory effect of CCCP and gramicidin on the function of TbAQP2 and TbAQP3 upon using a neutral solute at neutral pH. This emphasizes the relevance of appropriate controls in the experimental employment of ionophores. Furthermore, we aimed at exploring the uptake mechanism of pentamidine using a biotin-coupled derivative. Like pentamidine, the derivative was a nanomolar inhibitor of the glycerol permeability of TbAQP2, which was determined by light scattering measurements of osmotically sensitive *S. cerevisiae*. In contrast, the viability of trypanosomes was not affected. Nonspecific binding to the trypanosome surface hindered a microscopic examination of the proposed uptake via receptor-mediated endocytosis.

1 Einleitung

1.1 Protozoische, vektorübertragene Infektionen

Mehr als 80 % der Weltbevölkerung leben in einem Risikogebiet für eine vektorübertragene Krankheit (VBD, *vector-borne disease*) und mehr als 50 % in einem Gebiet, das von zwei oder mehr VBDs gefährdet ist (Golding *et al.*, 2015). Bei vektorübertragenen Krankheiten gelangt das Pathogen meist beim Blutmahl eines arthropodischen Wirts wie Mücken, Fliegen, Wanzen, Läuse oder Zecken in den menschlichen Organismus. Einige Vektoren übertragen dabei protozoische Erreger, einzellige eukaryotische Mikroorganismen, auf den Menschen (Wiser, 2011). Zu diesen protozoischen, vektorübertragenen Infektionen gehören sowohl die Malaria als auch einige vernachlässigte tropische Krankheiten (NTDs, *neglected tropical diseases*; Hotez *et al.*, 2020; WHO, 2010) wie die humane afrikanische Trypanosomiasis (HAT), die Leishmaniasis und die Chagas-Krankheit. Die Malaria gehört mit der Tuberkulose und einer Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) zu den häufigsten humanen Infektionskrankheiten (Bourzac, 2014; Vos *et al.*, 2020). Im Gegensatz dazu ist die Wahrnehmung von NTDs als allgemeines Gesundheitsproblem der Öffentlichkeit weniger präsent. Dazu tragen geringere Fallzahlen, aber auch eine überwiegende Auswirkung auf in Armut lebende und gesellschaftlich unterrepräsentierte Bevölkerungsgruppen bei (WHO, 2010). Neben ihrer Zugehörigkeit zu den protozoischen, vektorübertragenen Infektionskrankheiten (Abb. 1.1) sind der Malaria und der HAT gemeinsam, dass ihre Krankheitslast schwerpunktmäßig den afrikanischen Kontinent trifft. (WHO, 2010, 2020b). Ihre Erreger haben außerdem jeweils Mechanismen zur Umgehung des humanen Immunsystems entwickelt, sodass Chemotherapeutika für die Prophylaxe und Therapie unabdingbar sind (Büscher *et al.*, 2017; White *et al.*, 2014).

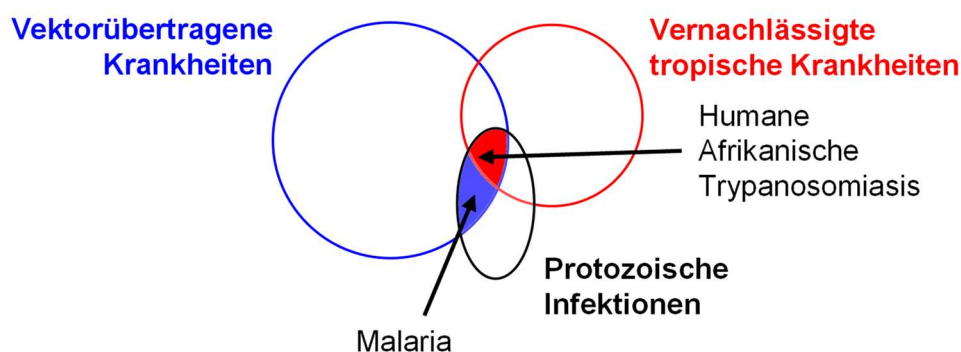


Abb. 1.1 Klassifizierung von Malaria und der humanen afrikanischen Trypanosomiasis. Die Malaria und die HAT gehören zu den durch Protozoen hervorgerufenen, durch Vektoren übertragenen Infektionskrankheiten. Letztere wird zudem als vernachlässigte tropische Krankheit klassifiziert. Die Darstellung ist schematisch und ist aufgrund der Vielzahl an Krankheiten und ihrer teils uneinheitlichen Klassifikation (WHO, 2010; Hotez *et al.*, 2020) nicht repräsentativ für die tatsächliche Anzahl.

Verschiedene Faktoren bedrohen trotz erheblicher Fortschritte in der Bekämpfung beider Infektionskrankheiten ihre endgültige Elimination. Dazu gehören auch Resistenzen gegen einige der zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika (WHO, 2014). Membranproteine (MPs) der protozoischen Erreger der HAT und der Malaria werden in diesem Kontext mit Resistenzen in Verbindung gebracht (Capela *et al.*, 2019; Graf & Mäser, 2017; Haldar *et al.*, 2018; Plowe *et al.*, 2007).

***Plasmodium sp.* und Malaria**

Unter dem Begriff Malaria werden Infektionskrankheiten zusammengefasst, welche durch die humanpathogenen Parasiten *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. knowlesi* hervorgerufen werden (White *et al.*, 2014). Etwa 94 % aller geschätzten Infektionen traten 2019 auf dem afrikanischen Kontinent auf (WHO, 2020b), wo Infektionen beinahe ausnahmslos durch *P. falciparum* hervorgerufen wurden (WHO, 2020b). Als zweitbedeutendster Erreger wurden 3 % aller 2019 berichteten Malariafälle durch *P. vivax* hervorgerufen (WHO, 2020b). Für die Malaria sind je nach Erreger in unterschiedlichen Abständen auftretende Fieberschübe charakteristisch. Die Fieberschübe werden im Rahmen der Entwicklung der Plasmodien in den humanen Erythrozyten durch das Platzen dieser und der damit einhergehenden inflammatorischen Immunantwort hervorgerufen (White *et al.*, 2014). Während der Blutmahlzeit infizierter, weiblicher *Anopheles*-Stechmücken werden die Parasiten auf den Menschen übertragen. Mit dem Wirtswechsel wechseln die einzelligen Parasiten auch von einer sexuellen zu einer asexuellen Vermehrung und befallen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien Leberzellen und Erythrozyten ihres menschlichen Wirts (Cowman *et al.*, 2016; White *et al.*, 2014). Im Erythrozyten befindet sich der Parasit in einer sogenannten parasitophoren Vakuole (Cowman *et al.*, 2016). Nach der Invasion wird die Wirtszelle aktiv umgestaltet und parasitäre Proteine werden in die Erythrozytenmembran eingebaut wie zum Beispiel das *P. falciparum* erythrozytäre Membranprotein 1 (PFEMP1). Dieses trägt durch Antigenvariation und zytoadhäsive Eigenschaften zu einem höheren Schweregrad der *P. falciparum* Malaria bei und erschwert zudem die Entwicklung eines Vakzins (Boddey & Cowman, 2013).

Zur Prävention und Therapie der Malaria stehen Maßnahmen zur Verfügung (WHO, 2015b). Seit dem globalen Malariaeradikationsprogramm der WHO 1969 wurden die Bemühungen zur Vektorkontrolle und Eradikation der Krankheit erst wieder mit Beginn der 21. Jahrhunderts intensiviert. Diese neuen Bemühungen hat die WHO als goldene Ära der Malariakontrolle bezeichnet (WHO, 2020b). Seit 2015 werden die Fortschritte jedoch mit langsameren Raten erzielt (WHO, 2020b). Während die Fallinzidenz von 2000 bis 2015 um 27 % gefallen ist, nahm diese im Zeitraum von 2015 bis 2019 nur noch um weniger als 2 % ab. Ähnliches wurde auch für die Mortalitätsrate beobachtet, die nach einem Rückgang um 52 % von 2000-2015 nur noch um 17 % von 2015-2019 gesunken ist (WHO, 2020b). In absoluten Zahlen wurden 2019

geschätzt noch 229 (95 %-Konfidenzintervall: 211-252) Millionen Fälle und 409.000 (95 %-Konfidenzintervall: 387.000-460.000) Todesfälle verzeichnet. Von letzterem betrug der Anteil von Kindern unter 5 Jahren 67 % (WHO, 2020b). Um die bis zum Jahr 2030 gesetzten Ziele zur weltweiten Malariabekämpfung (WHO, 2015a) einzuhalten, werden die Fortschritte nicht mit der geforderten Geschwindigkeit erzielt (Ren, 2019). Seit 2010 stagnieren die Fördermittel und die Lücke zwischen den erforderlichen finanziellen Mitteln zur Einhaltung der gesetzten Ziele und den tatsächlich investierten wird zunehmend größer (WHO, 2020b). Zusätzlich erschweren Resistenzen gegen Insektizide (Hemingway *et al.*, 2016) und Chemotherapeutika (Haldar *et al.*, 2018) die endgültige Elimination der Krankheit.

***Trypanosoma brucei* ssp. und die Humane afrikanische Trypanosomiasis**

Zusammen mit der tierischen Form, Nagana, stellt die HAT ein ernsthaftes Entwicklungshindernis im ländlichen Afrika südlich der Sahara dar, wo ein Großteil der berichteten HAT-Infektionen auftritt (WHO, 2010). In 98 % der Fälle ist der verursachende Erreger *T. brucei gambiense* (Franco *et al.*, 2020), welcher eine langsam fortschreitende Form der HAT auslöst (Büscher *et al.*, 2017) und in West- und Zentralafrika endemisch ist (Simarro *et al.*, 2010). Die übrigen Fälle werden durch *T. b. rhodesiense* verursacht (Franco *et al.*, 2020), deren Verbreitungsschwerpunkt in Ost- und Südafrika liegt (Simarro *et al.*, 2010). Vieh, insbesondere Rinder, stellen ein wichtiges Reservoir für diese Subspezies dar, die für die Tiere nicht pathogen ist (Fèvre *et al.*, 2001; Onyango *et al.*, 1966). Im Gegensatz zu der von *T. b. gambiense* verursachten HAT wird eine akute Verlaufsform ausgelöst, die innerhalb von sechs Monaten zum Tod führen kann (Büscher *et al.*, 2017). Eine HAT ist ohne Behandlung meist letal (WHO, 2010). Insbesondere im zweiten Stadium, wenn der Erreger das zentrale Nervensystem erreicht hat, treten eine Reihe neurologischer Störungen auf, die die Betroffenen körperlich und geistig einschränken (WHO, 2010).

Auf den Menschen werden die protozoischen Parasiten durch den Biss der Tsetse-Fliege (*Glossina* spp.) übertragen (Büscher *et al.*, 2017). Die Trypanosomen durchlaufen in ihren Wirten einen mehrstufigen Entwicklungsprozess (Fenn & Matthews, 2007; Matthews, 2005). Im Menschen verteilen sie sich in der frühen Phase der Infektion über die Blut- und Lymphbahnen und treten im späteren Verlauf ins zentrale Nervensystem über (Büscher *et al.*, 2017). Wie Plasmodien haben Trypanosomen Mechanismen entwickelt, um die humane, humorale Immunantwort zu erschweren (Borst, 2002). In der Blutform sind die Trypanosomen von einer dichten, etwa 15 nm dicken Schicht aus Dimeren des *variant surface glycoprotein* (VSG) bedeckt (Bartossek *et al.*, 2017; Schwede *et al.*, 2015). Je ein VSG wird zurzeit exprimiert, variiert jedoch stetig (Mugnier *et al.*, 2016). Wird ein VSG von einem Antikörper erkannt, wird der VSG-Antikörper-Komplex durch Endozytose in der Flagellartasche der Trypanosomen von der Oberfläche entfernt (Engstler *et al.*, 2007).

2018 wurden historisch niedrige Fallzahlen von insgesamt weniger als 1.000 Fällen an die WHO berichtet, was einen Rückgang um 96 % für *T. b. gambiense* und 97 % für *T. b. rhodesiense* gegenüber den im Jahr 2000 berichteten Zahlen bedeutete (Franco *et al.*, 2020). Trotz dieses Fortschritts in der HAT-Kontrolle sind die absoluten Zahlen aufgrund der Dunkelziffer der nicht berichteten Fälle kritisch zu betrachten. Die WHO selbst schätzte 1995 die Zahl der jährlichen Fälle mit 300.000 etwa zehnmal (WHO, 1998) und für 2004 mit 50.000-70.000 Fällen etwa drei- bis viermal höher als die Zahl der Fallberichte (WHO, 2006). Die Nichtregierungsorganisation *Médicins sans Frontières* weist darauf hin, dass Faktoren wie politische Unsicherheit und logistische Einschränkungen in sehr abgeschiedenen ländlichen Gebieten die HAT-Überwachung erschweren. Die meisten Patienten würden keine Behandlung erhalten und daher nicht erfasst werden (Chappuis *et al.*, 2010).

Ähnlich zu den bei prokaryotischen Erregern verbreiteten Antibiotikaresistenzen haben auch eukaryotische Mikroorganismen wie die protozoischen Parasiten Resistenzmechanismen gegen ihre Chemotherapeutika entwickelt. Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe sind mit einem schlechteren klinischen Behandlungsergebnis assoziiert, können Folgeschäden verursachen, die Mortalitätsrate erhöhen und zusätzliche Kosten verursachen (Cohen & Tartasky, 1997; WHO, 2014), deren Ausmaß unterschätzt wird (Smith & Coast, 2013). Auf die molekularen Resistenzmechanismen eukaryotischer Mikroorganismen sowie die speziell in der Malaria- und HAT-Therapie auftretenden Resistenzen wird im Folgenden eingegangen.

1.2 Resistenzmechanismen eukaryotischer Mikroorganismen

Für persistierende Pathogensubpopulationen, also solche, die eine Behandlung mit einer pharmakologisch aktiven Substanz überlebt haben, wird diskutiert, dass sie als Reservoir für die Entwicklung von Resistenzen dienen können (Cohen *et al.*, 2013). Zusammen mit suboptimalen Dosisregimes könnten so Resistenzentwicklungen begünstigt werden (Fairlamb *et al.*, 2016). Im Gegensatz zur Persistenz sind die genetischen Verursacher von Resistenzen vererbbar (Fairlamb *et al.*, 2016). Die genetischen Faktoren, die Resistenzen vermitteln, können bereits intrinsisch vorhanden sein, durch spontane Mutagenese entstehen oder durch den Transfer von genetischem Material erworben werden (Cohen & Tartasky, 1997). Während Bakterien resistenzvermittelnde Gene über Plasmide austauschen können, ist ein solcher Transfer für protozoische Parasiten bisher nicht beschrieben (Fairlamb *et al.*, 2016). Für eukaryotische Mikroorganismen sind verschiedene molekulare Mechanismen bekannt, die einzeln oder in Kombination die zelluläre Toxizität der gegen sie eingesetzten Chemotherapeutika verringern. Diese wurden von Fairlamb *et al.* (2016), wie im Folgenden beschrieben, zusammengefasst und sind in Abb. 1.2 schematisch dargestellt. Die Zielstruktur für den Wirkstoff kann fehlen oder durch Mutationen so modifiziert sein, dass die Affinität verringert ist (Abb. 1.2, A). Bei der Modifikation der Zielstruktur reicht im Extremfall eine

einzelne Punktmutation aus, um die Affinität zur Zielstruktur bedeutend abzuschwächen. Zum Beispiel wird eine im Labor hervorgerufene Resistenz von *P. falciparum* gegen einen nanomolaren Inhibitor des Formiat-Nitrit-Transporters (PfFNT) durch einen einzelnen Aminosäureaustausch (G107S) in der Zielstruktur vermittelt (Golldack *et al.*, 2017).

Ein weiterer allgemeiner Resistenzmechanismus ist die Reduktion der Wirkstoffkonzentration, welche bei intrazellulären Zielstrukturen auf verschiedenen Wegen herbeigeführt werden kann (Abb. 1.2, B). Eine Inaktivierung des Wirkstoffs oder eine fehlende Aktivierung eines Prodrugs verringert die Konzentration an pharmakologisch aktiver Substanz am Wirkort. Zum Beispiel vermittelt eine Mutation in *fcy1*-Gen eine reduzierte enzymatische Aktivität der Cytosin-Deaminase, welche an der Aktivierung des Antimykotikum-Prodrugs 5-Fluorocytosins beteiligt ist (Edlind & Katiyar, 2010; Vandeputte *et al.*, 2011).

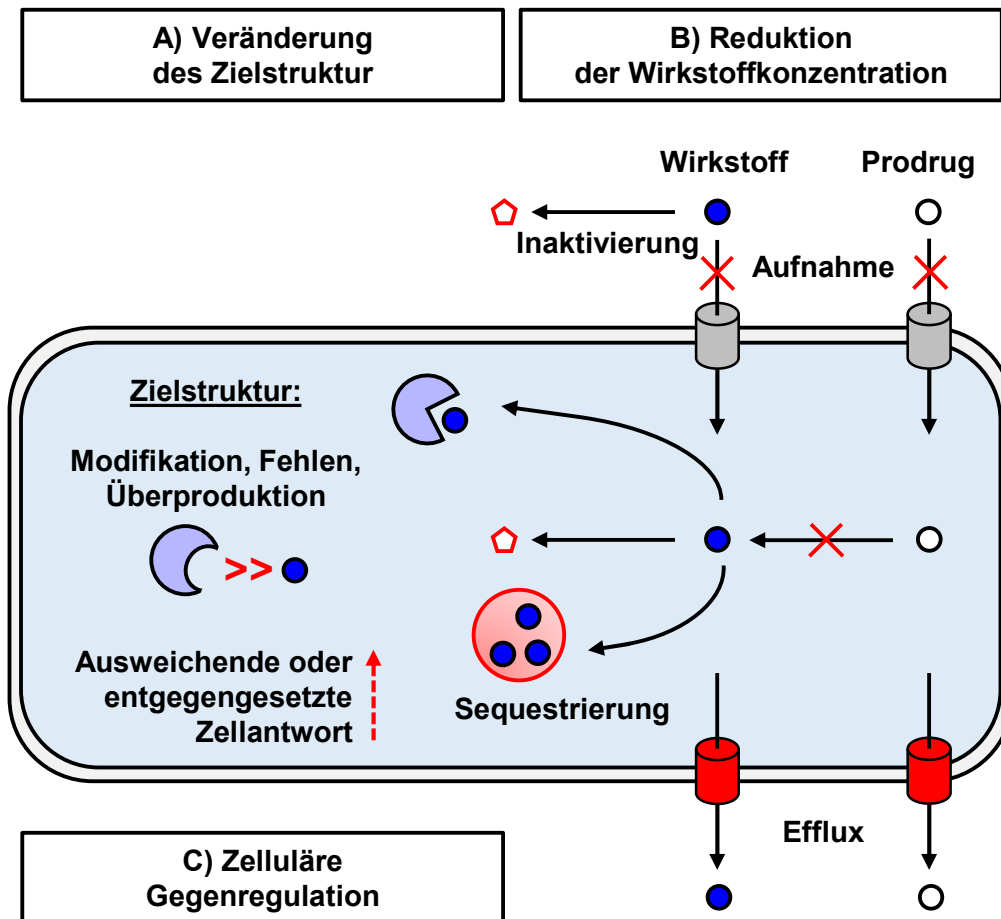


Abb. 1.2 Resistenzmechanismen eukaryotischer Mikroorganismen. A) Durch Modifikation der Zielstruktur kann die Affinität des Wirkstoffs zu dieser verringert sein. Die Zielstruktur kann auch vollständig fehlen. B) Die intrazelluläre Wirkstoffkonzentration kann durch eine verminderte Aufnahme, einen verstärkten Efflux, eine Inaktivierung oder fehlende Aktivierung sowie durch Sequestrierung, d.h. durch zum Beispiel eine Ansammlung in einer Zellorganelle wie einer Vakuole, reduziert sein. C) Bei einer Überproduktion der Zielstruktur kann die pharmakologische Wirkung abgeschwächt sein. Diese kann auch durch andere zelluläre Gegenregulationen wie Reparaturmechanismen oder ausweichende metabolische Wege abgeschwächt werden. Die Abbildung ist an Fairlamb *et al.* (2016) angelehnt.

Auch eine verringerte Aufnahme sowie ein verstärkter Efflux können die intrazelluläre Wirkstoffkonzentration verringern. Dabei kann die Passage über die Zellmembran durch integrale Proteine vermittelt werden (Abb. 1.2, B). Ein Beispiel hierfür ist ein spezieller Kanal, das Aquaporin (AQP) 1, in der Zellmembran der protozoischen *Leishmania*-Parasiten. Dieser vermittelt die Aufnahme der Arsen und Antimon enthaltenden Arzneistoffe als As^{III} und Sb^{III} (Gourbal *et al.*, 2004; Marquis *et al.*, 2005). Durch den Verlust von AQP1 kann eine Resistenz gegen metalloide Arzneistoffe hervorgerufen werden (Gourbal *et al.*, 2004). In *Leishmania* transportiert auch ein intrazellulärer ABC-Transporter (ABC, ATP-binding cassette) Metall-Thiol-Konjugate in Vakuolen, um diese durch Exozytose zu detoxifizieren (Légaré *et al.*, 2001).

Schließlich können zelluläre Regulationen aktiviert werden, die der pharmakologischen Wirkung entgegenwirken (Abb. 1.2, C). Zellschäden können repariert oder ausweichende metabolische Wege aktiviert werden (Fairlamb *et al.*, 2016). Auch über die Regulation der Expression und damit über die Anzahl der Zielstrukturen kann der Effekt eines Wirkstoffs beeinflusst werden, wie dies zum Beispiel an *Leishmania*-Parasiten in Abhängigkeit von den Expressionslevel von AQP1 gezeigt wurde (Gourbal *et al.*, 2004).

1.3 Resistenzmechanismen von *P. falciparum* und PfCRT

Gegen alle bekannten antiplasmodialen Arzneistoffe sind Resistenzen bekannt (Haldar *et al.*, 2018). Auf die Resistenzlage reagierten nationale Behandlungsstrategien in der Vergangenheit mit geänderten Therapieempfehlungen (Bloland *et al.*, 1993; Kamya *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2006). Eine Resistenz gegen Antimalariamittel wird definiert als Fähigkeit eines Parasitenstammes trotz der Verabreichung und der Absorption eines Arzneimittels zu überleben oder sich zu vermehren. Das Arzneimittel wird dabei in einer adäquaten Dosis verabreicht, die mindestens der üblicherweise empfohlenen entspricht und vom Patienten toleriert wird (WHO, 1967). Eine Resistenz kann verschiedene Schweregrade annehmen (White, 2002). Auf einem niedrigen Level tritt bei einem Teil der behandelten Patienten eine Rekrudescenz auf, die sich als erneute Parasitämie trotz Behandlung äußert. Diese tritt mit steigendem Resistenzlevel zunehmend früher ein. Auf einem hohen Resistenzlevel schlägt die Behandlung fehl, da die Parasitenlast nicht ausreichend reduziert werden kann (White, 2002). Eine Verlangsamung der Bereinigung des Blutes von der Parasitenlast ist ein Anzeichen für eine zunehmende Resistenz der Parasiten gegenüber dem Arzneistoff. So äußert sich auch die in Südostasien beobachtete partielle Resistenz gegen die potenteste Arzneistoffklasse, die Artemisin-Derivate (Dondorp *et al.*, 2009; Noedl *et al.*, 2008). Diese sind zurzeit in Kombination mit ausgewählten anderen antiplasmodialen Arzneistoffen das Mittel der ersten Wahl für die Behandlung einer unkomplizierten *P. falciparum* Malaria (WHO, 2020b). Zusätzlich zur Empfindlichkeit der Parasiten gegenüber dem antiplasmodialen Arzneistoff ist der individuelle Behandlungserfolg von weiteren Faktoren abhängig (WHO, 2020a). Dies sind zum Beispiel

die initiale Parasitenlast im Patienten, die Therapieadhärenz, die Qualität und Dosis des verabreichten Arzneimittels und der Immunstatus aufgrund vorangegangener Infektionen (WHO, 2020a). Für eine Einschätzung der Empfindlichkeit der Parasiten wurden molekulare Marker identifiziert. Diese stellen ein nützliches Instrument dar, um regionale Resistenzlagen einzuschätzen und Strategien zur Behandlung und Chemoprophylaxe anzupassen (Djimé *et al.*, 2004; Plowe *et al.*, 2007). Sie können als Frühwarnsignal für Veränderungen der Resistenzlage in einem Gebiet oder einer Population dienen und ein Therapieversagen aufgrund einer Resistenz bestätigen (WHO, 2020a).

Die genetischen Mechanismen, die mit einer antiplasmodialen Resistenz assoziiert sind, beruhen vorherrschend auf Mutationen oder einer veränderten Anzahl an Kopien von Genen, die entweder für die Zielstruktur der Wirkstoffe oder für Effluxproteine kodieren (Haldar *et al.*, 2018; WHO, 2015b). Als Resistenzmarker für mehrere antiplasmodiale Arzneistoffe gelten die zwei Gene *pfmdr1* und *pfcr1*. Diese kodieren für Effluxproteine, die in der Membran der Verdauungsvakuole, einem Wirkort vieler antiplasmodialer Arzneistoffe, lokalisiert sind (Cowman *et al.*, 1991; Fidock *et al.*, 2000). Das Gen *pfmdr1* kodiert für den plasmodialen *multi drug resistance transporter* 1 (PfMDR1), welcher homolog zu dem in multiresistenten Tumorzellen vorkommenden P-Glykoprotein (Pgp) ist (54 % Ähnlichkeit) (Foote *et al.*, 1989) und daher auch Pgh1 genannt wird (Cowman *et al.*, 1991). Die Amplifikationslevel von *pfmdr1* korrelieren mit einer Parasitenresistenz gegen Mefloquin und Lumefantrin (Price *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2006). Mutationen in *pfcr1* wurden als Resistenzmarker für Chloroquin (CQ) identifiziert und das translatierte Protein daher *P. falciparum* Chloroquin-Resistenz-Transporter (PfCRT) genannt (Fidock *et al.*, 2000).

Der *Plasmodium falciparum* Chloroquin-Resistenz-Transporter (PfCRT)

Wellems *et al.* (1990) kreuzten Parasiten eines aus Honduras stammenden, chloroquin-sensiblen (CQS) Klons HB3 mit dem indochinesischen, chloroquinresistenten (CQR) Klon Dd2. Durch Sequenzanalysen der Nachkommen wurde die Resistenzdeterminante von Wellems *et al.* (1991) auf einem etwa 400 kb großen Segment auf Chromosom 7 ausfindig gemacht, der von Su *et al.* (1997) auf einen 35 kb großen Abschnitt eingegrenzt wurde. Auf diesem identifizierten Fidock *et al.* (2000) schließlich das 3,1 kb umfassende, in 13 Exons zerteilte Gen *pfcr1*. Das Genprodukt ist der 48,6 kDa schwere, aus 424 Aminosäuren aufgebaute PfCRT. Seine Lokalisation in der Membran der Verdauungsvakuole wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in Trophozoiten und Schizonten bestätigt (Fidock *et al.*, 2000). Diese steht in Übereinkunft mit der Verdauungsvakuole als postuliertem Wirkort von CQ (Aikawa, 1972) und der Anreicherung von CQ in diesem Zellkompartiment (Yayon *et al.*, 1984, 1985). Zu letzterem trägt das Ionenfallenprinzip bei, da CQ (pK_{s1} 8,1; pK_{s2} 10,2; Irvin & Irvin, 1947) nach passiver Diffusion in der ungeladenen Form (Abb. 1.3, A) in der sauren Vakuole

(pH \approx 4,5-5,5; Hayward *et al.*, 2006; Klonis *et al.*, 2007; Yayon *et al.*, 1984) mehrheitlich protoniert vorliegt. Der PfCRT wird in allen intraerythrozytären Stadien exprimiert, wobei eine leicht erhöhte PfCRT-Expression im Trophozoitenstadium beobachtet wurde (Gligorijevic *et al.*, 2008).

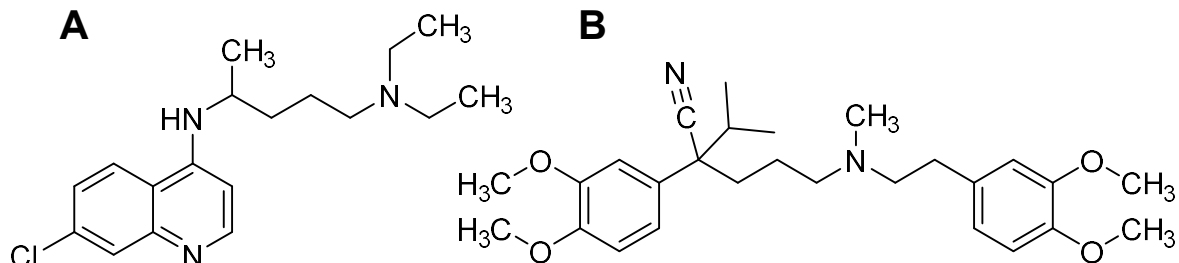


Abb. 1.3 Strukturen von (A) Chloroquin (CQ), einem antiplasmodialen Arzneistoff, und (B) Verapamil (VP), einem *resistance reverser* von CQ-resistenten Plasmodien.

Phänotypisch kennzeichnen resistente Parasiten eine erhöhte halbmaximale Inhibitions-konzentration (IC_{50}) (Martin *et al.*, 1987; Verdier *et al.*, 1985), eine verringerte Arzneistoff-akkumulation (Fitch, 1969; Fitch, 1970; Macomber *et al.*, 1966) beziehungsweise ein erhöhter CQ-Efflux (Krogstad *et al.*, 1987) sowie dessen partielle Reversibilität durch sogenannte *resistance reverser* wie Verapamil (VP) (Abb. 1.3, B), einem Arzneistoff aus der Klasse der Calciumantagonisten (Krogstad *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1987). Es gibt jedoch auch VP-unempfindliche CQR-Parasitenlinien (van Schalkwyk & Egan, 2006). Aufgrund der recht langsamen geographischen Ausbreitung und der ähnlichen Phänotypen verschiedener CQR-Parasitenstämme wurde vermutet, dass diese eine Resistenz nach demselben Mechanismus und damit wahrscheinlich über genetische Veränderungen in einem einzelnen Genlocus erworben haben (Wellems *et al.*, 1990). Einige Studien vermuteten eine multigenetische Ursache und sahen Polymorphismen oder die Amplifikationslevel des *pfdmr1*-Gens als mitverantwortlich (Foote *et al.*, 1990; Reed *et al.*, 2000). Dies wird kontrovers diskutiert, da verschiedene Studien keine Assoziation dieser mit einem CQR-Phänotyp zeigten (Chaijaroenkul *et al.*, 2011; Wellems *et al.*, 1990).

Der PfCRT wird der Superfamilie der *drug/metabolite transporter* (DMT) zugeordnet (Martin & Kirk, 2004; Tran & Saier, 2004). Die bioinformatischen Analysen sagen zehn Transmembrandomänen (TM 1-10) vorher sowie eine Orientierung in der Vakuolenmembran mit zytosolischen Termini. Eine hohe Ähnlichkeit zwischen den TM 1-5 und TM 6-10 wird auf ein Genduplikationsereignis zurückgeführt, wie es auch für andere Proteine in der DMT-Superfamilie angenommen wird (Jack *et al.*, 2001). Martin und Kirk (2004) vermuteten eine Dimerisierung des Proteins aufgrund eines Aminosäuremotives in den TM 5 und TM 10 (GXXXXXT). Dieses stellt in abgewandelter Form ein unter MPs weit verbreitetes Motiv für Helix-Helix-Interaktionen dar (Liu *et al.*, 2002).

PfCRT-Polymorphismen

CQR-Parasiten unterscheiden sich durch den Austausch einer Reihe von Aminosäureresten im PfCRT von CQS-Parasiten (Fidock *et al.*, 2000). Tab. 1.1 gibt eine Übersicht über die Aminosäurereste an bestimmten Positionen in ausgewählten PfCRT-Varianten, ihren Resistenzstatus sowie ihren Ursprung. Als Schlüsselmutation gilt die Substitution eines Lysins an Position 76 durch ungeladene Aminosäuren (Fidock *et al.*, 2000; Lakshmanan *et al.*, 2005). An dieser Position fanden Fidock *et al.* (2000) in allen 24 von ihnen untersuchten CQR-Parasitenlinien einen Threoninrest (K76T). Nur in wenigen Ausnahmen wurde ein anderer Aminosäurerest an dieser Position in CQR-Parasiten gefunden: K76I (Cooper *et al.*, 2002; Fidock *et al.*, 2000), K76N (Cooper *et al.*, 2002) und K76A (Chaijaroenkul *et al.*, 2011). Dabei wurden die ersten beiden nur *in vitro* erzeugt.

Tab. 1.1 PfCRT-Varianten ausgewählter Parasitenlinien.

Linie	Status	Ursprung	Aminosäureposition											Ref.
			72	74	75	76	144	160	220	271	326	356	371	
HB3	CQS	Honduras	C	M	N	K	A	L	A	Q	N	I	R	1, 2
3D7		Niederlande	C	M	N	K	A	L	A	Q	N	I	R	1
106/1		Sudan	C	I	E	K	A	L	S	E	S	I	I	1
Dd2	CQR	Indochina	C	I	E	T	A	L	S	E	S	T	I	1, 2
GB4		Ghana	C	I	E	T	A	L	S	E	N	I	I	2
7G8		Brasilien	S	M	N	T	A	L	S	Q	D	L	R	1, 2
Ecu1110		Ecuador	C	M	N	T	A	L	S	Q	D	L	R	1, 2
Ph1		Philippinen	C	M	N	T	T	Y	A	Q	D	I	R	3
Ph2		Philippinen	S	M	N	T	T	Y	A	Q	D	I	R	3

Bemerkung: Abweichungen vom chloroquinsensiblen (CQS) Wildtyp sind grau hinterlegt. Referenzen: 1: Fidock *et al.* (2000); 2: Summers *et al.* (2014); 3: Chen *et al.* (2003)

Hinsichtlich ihrer Mutationen lassen sich die CQR-PfCRT-Isoformen in zwei Gruppen einteilen (Tab. 1.1). In Süd-Ost-Asien und Afrika dominieren solche mit einer CVIET-Sequenz von Position 72-76. In Südamerika und den Philippinen dominieren hingegen Isoformen mit der SVMNT-Sequenz (Position 72-76). Dies steht im Einklang mit der Theorie, dass sich CQR-Parasiten regional unabhängig voneinander entwickelt haben (Fidock *et al.*, 2000). Nachdem zunächst mindestens zwei Gebiete angenommen wurden (Payne, 1987), weisen Sequenzanalysen auf Basis der *pfcr*-Mutationen und der angrenzenden Mikrosatelliten auf mindestens vier Ursprünge hin: Asien, Papua-Neuguinea und zwei in Südamerika (Wootton *et al.*, 2002). In dem Mutationsmuster spiegelt sich auch wieder, dass der genetische Ursprung von afrikanischen CQR-Parasiten in Asien angenommen wird (Ariey *et al.*, 2006; Wootton *et al.*, 2002). Die CQ-Resistenz der Dd2-Parasitenlinie, die nach ihrem Mutationsmuster der asiatisch-afrikanischen Gruppe zuzuordnen ist, ist verapamilempfindlich, während die der 7G8-Parasitenlinie aus der südamerikanisch-westpazifischen Gruppe dies nicht ist (van Schalkwyk & Egan, 2006).

CQS-Parasitenlinien enthalten üblicherweise die PfCRT-Wildtyp-Sequenz, wie sie in Tab. 1.1 für die Linien HB3 und 3D7 angegeben ist. *In vivo* weisen die Parasitenlinien unterschiedliche Empfindlichkeitsprofile gegenüber antiplasmodialen Wirkstoffen auf (Rathod *et al.*, 1997). So sind zum Beispiel die HB3- und die 3D7-Linie beide empfindlich gegenüber CQ. HB3 ist jedoch gegen Pyrimethamin resistent (Walliker *et al.*, 1987), während 3D7 weniger empfindlich gegenüber Sulfadoxin ist (Wang *et al.*, 1997). Von den 16 von Fidock *et al.* (2000) untersuchten CQS-Parasitenlinien war nur die 106/1-Linie aus dem Sudan auffällig. Diese Ausnahme war besonders, da sie Merkmale der asiatischen und afrikanischen CQR-Varianten trug, jedoch an der kritischen Position 76 das für CQS-Parasiten kanonische Lysin (K76) aufwies. Unter CQ-Selektion mutierte diese ursprünglich empfindliche Linie und wurde durch eine einzelne Punktmutation an Position 76 (K76I) resistent (Fidock *et al.*, 2000).

Validität als Resistenzmarker und vermuteter Resistenzmechanismus von PfCRT

Der Genotyp von *pfcr*t ist im Allgemeinen ein zuverlässiger Resistenzmarker. In einer Metaanalyse aus 13 Studien aus 1999 bis 2008 berechneten Picot *et al.* (2009) die *Odds Ratio*¹ für ein Therapieversagen bei Anwesenheit der K76T-Mutation. Diese zeigten eine klare Assoziation zwischen der K76T-Mutation und einem Therapieversagen. Die *Odds Ratio* betrugen 2,1 (95 %-Konfidenzintervall: 1,5-3,0; $p < 0,001$) (Follow-up nach 14 Tagen) bzw. 7,2 (95 %-Konfidenzintervall: 4,5-11,5; $p < 0,001$) (Follow-up nach 28 Tagen). Die Prävalenz von K76T in Patienten mit einem Therapieversagen kann bis zu 100 % betragen, was eine Selektion resistenter Parasiten anzeigt (Djimé *et al.*, 2001). Ein Therapieversagen erfolgt jedoch nicht zwangsläufig bei Befall mit Parasiten des K76T-Genotyps. Insbesondere das Alter (> 4 Jahre) und eine gewisse erworbene Immunität tragen zu einem erfolgreichen Therapieausgang trotz K76T-Mutation bei (Djimé *et al.*, 2003).

Die Position 76 liegt nach der bioinformatischen Analyse von Martin und Kirk (2004) in der ersten TM auf Seiten der Verdauungsvakuole. Die Autoren vermuteten daher, dass die positive Ladung des Lysinrests (K76) das in der Verdauungsvakuole zweifach positiv geladene CQ abstößt. Bei Mutation des Lysinrest zu einem ungeladenen Aminosäurerest könnte der PfCRT einen Efflux von CQ aus der Verdauungsvakuole vermitteln (Martin & Kirk, 2004). Aufgrund einer Alkalisierung der Verdauungsvakuole von CQR-Parasiten bei gehemmten Protonenpumpen, gibt es Hinweise für eine gemeinschaftliche Passage von CQ mit Protonen (Lehane *et al.*, 2008; Lehane & Kirk, 2008). Als Mechanismus wurde sowohl ein „*drug leakage*“-Modell entlang des Konzentrationsgradienten (Bray *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2004) als auch eine

¹ Die *Odds Ratio* (OR) geben das Verhältnis zweier *Odds* wieder, nämlich dem *Odd*, dass ein bestimmter Ausgang bei Anwesenheit einer bestimmten Variablen eintritt, zu dem *Odd*, dass der Ausgang ohne diese Variable eintritt. Ein *Odd* berechnet sich aus dem Verhältnis der Wahrscheinlichkeit für ein Ereignis zur Wahrscheinlichkeit, dass dieses nicht eintritt (Bland & Altman, 2000). Ein OR > 1 zeigt an, dass die untersuchte Variable mit einem höheren *Odd* für den untersuchten Ausgang assoziiert ist (Szumilas, 2010).

Funktion des PfCRT als sekundär aktiver Carrier vorgeschlagen (Sanchez *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2007; Summers & Martin, 2010).

Sequenzanalysen wie von Fidock *et al.* (2000) und Djimdé *et al.* (2001) zeigen, dass die K76T-Mutation nicht ohne weitere Mutationen auftritt. Der Einfluss der Mutationen auf die Aufnahme von [³H]-CQ über rekombinanten PfCRT wurde in Oozyten von *Xenopus laevis* ausführlich untersucht (Bakouh *et al.*, 2017; Bellanca *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2009; Summers *et al.*, 2014). Der PfCRT^{Dd2} (CQR) vermittelte eine etwa 5- bis 10-fach höhere [³H]-CQ-Aufnahme als die Kontrolle und bekräftigte damit den angenommenen Efflux-Resistenzmechanismus in Plasmodien (Martin *et al.*, 2009). Eine Aufnahme in Oozyten entspricht aufgrund der Orientierung in der Plasmamembran einem Export aus der plasmodialen Verdauungsvakuole. Die komplexe Bedeutung der Mutationen zeigte sich, als die K76T-Mutation allein nicht ausreichte, um eine [³H]-CQ-Aufnahme in die Oozyten zu vermitteln (Martin *et al.*, 2009; Summers *et al.*, 2014). Die Einführung der Wildtyp-Aminosäure an Position 76 (T76K) in PfCRT^{Dd2} erniedrigte jedoch die Aufnahme wieder auf das Level der Negativkontrolle (Martin *et al.*, 2009) und bestätigte K76T Rolle als Schlüsselmutation für eine CQ-Resistenz. Dieser Effekt wurde auch in Untersuchungen mit Plasmodien beobachtet. Eine Wiedereinführung des Lysins an Position 76 in PfCRT^{Dd2} und PfCRT^{T76K} führte zu einer Resensibilisierung von CQR-Parasiten (Lakshmanan *et al.*, 2005).

Mutmaßliche *trafficking*-Motive in den Termini mussten entfernt werden, um eine Lokalisation an der Plasmamembran der Oozyten zu gewährleisten (Martin *et al.*, 2009). Zudem vermittelte der Wildtyp nur eine [³H]-CQ-Aufnahme auf Diffusionslevel (Martin *et al.*, 2009; Summers *et al.*, 2014). Abweichend dazu wurde ein CQ-Transport in anderen Expressionssystemen über das Wildtyp-Protein beschrieben (Baro *et al.*, 2011; Juge *et al.*, 2015). Ein Weg zum besseren Verständnis der Funktion führt über die Proteinstruktur.

Zur Strukturaufklärung plasmodialer Membranproteine

Das Fehlen dreidimensionaler Proteinstrukturen erschwert das Verständnis, wie MPs funktionieren, wie sie in Krankheiten involviert sind und wie ihre Funktion mit kleinen Molekülen moduliert werden kann (Mus-Veteau, 2010). Das gestiegene Interesse und der Stellenwert von Strukturinformationen spiegeln sich auch in der steigenden Anzahl der jährlich veröffentlichten Strukturen wider. Die Zahl der bekannten einzigartigen MP-Strukturen nimmt jährlich zu (Abb. 1.4, A). Die Datenbank *Membrane Proteins of Known 3D Structure* listet derzeit insgesamt 1209 einzigartige MP-Strukturen (White, 30.01.21). Wenn mehrere Strukturen desselben Proteins, von modifizierten Proteinen oder solche mit verschiedenen gebundenen Liganden berücksichtigt werden, erhöht sich diese Zahl auf 4636 MP-Strukturen. Dies entspricht 3 % der 152.731 hinterlegten *protein-only* Strukturen in der *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000; RCSB Protein Data Bank, 30.01.21) (Abb. 1.4, B).

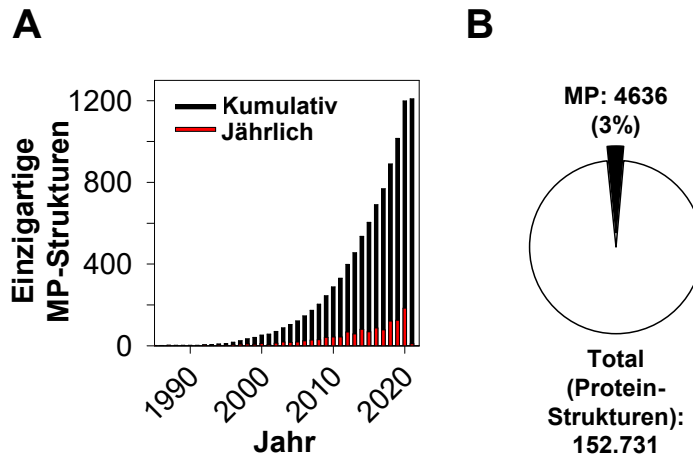


Abb. 1.4 Membranprotein-Strukturen in den Proteindatenbanken. (A) Anzahl der pro Jahr veröffentlichten, einzigartigen Strukturen von Membranproteinen (MPs) seit 1985, als mit dem photosynthetischen Reaktionszentrum von *Blastochloris viridis* die erste MP-Struktur von Deisenhofer *et al.* (1985) veröffentlicht wurde (*Membrane Proteins of Known 3D Structure*, Stand: 30.01.21). (B) Die Zahl der MP-Strukturen entspricht nur 3 % der bekannten *protein-only* Strukturen (*Protein Data Bank*, Stand: 03.02.01, Einträge nach dem 30.01.21 wurden nicht berücksichtigt).

Der Arbeitsprozess gliedert sich in die Expression, Reinigung und die Analytik zur Strukturaufklärung (Abb. 1.5). Die wichtigsten Methoden für letzteres sind die röntgendiffraktometrische Untersuchung von Kristallen und die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR; *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) (Hol & Verlinde, 2001). Die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) gilt als revolutionierende Methode in diesen Bereich (Callaway, 2020; Kühlbrandt, 2014a) und gewinnt zunehmend an Bedeutung (Callaway, 2020; Fernandez-Leiro & Scheres, 2016). Der Erhalt des Zielproteins in hoher Quantität, Qualität und Reinheit stellt eine der Herausforderungen in der Arbeit mit MPs dar (Lundstrom, 2006).

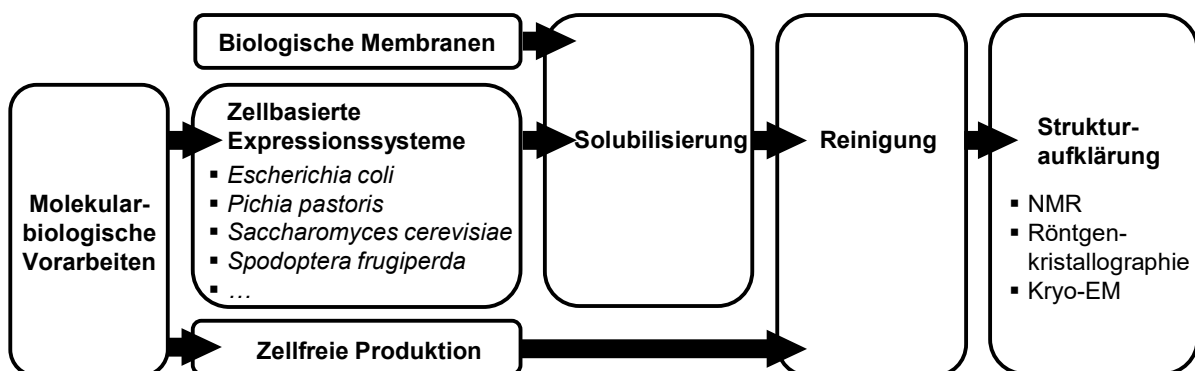


Abb. 1.5 Der Arbeitsprozess für die Strukturaufklärung eines Membranproteins.

Während die ersten MP-Strukturen nach der Isolation aus ihren natürlichen Geweben ermittelt wurden (z.B. Allen *et al.*, 1987; Deisenhofer *et al.*, 1985; Stock *et al.*, 1999; Toyoshima *et al.*, 2000), gewinnt die heterologe Überexpression in Fremdorganismen an Bedeutung, um sie einer funktionellen und strukturellen Untersuchung zugänglich zu machen (Mus-Veteau, 2010;

Tate, 2001; Wagner *et al.*, 2006). Die verbreitesten zellbasierten Systeme für die Produktion eukaryotischer MPs sind Insektenzellen (z.B. *Spodoptera frugiperda*, Sf9), Hefezellen (*Pichia pastoris*, *S. cerevisiae*), Bakterien (*E. coli*) und Säugetierzellen (z.B. *human embryonic kidney cells*, HEK-Zellen), wobei jedes Expressionssystem besondere Stärken, Schwächen und Limitationen hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen am Protein sowie der Effektivität, dem zeitlichem Aufwand und der Kosten für die Produktion kennzeichnet (He *et al.*, 2014). Je nach Zellsystem ist für eine lohnende Ausbeute die Fermentation mehrerer Liter Kultur notwendig, verlängert sich dieser Prozess durch eine Induktion der Proteinproduktion oder müssen geeignete Klone zunächst vorselektiert werden (Andréll & Tate, 2013; He *et al.*, 2014; Katzen *et al.*, 2005).

Alternativ zu zellbasierten Expressionssystemen gibt es die zellfreie (CF, *cell-free*) Proteinproduktion. Diese stellt ein artifizielles System dar, in dem auf Basis von Zelllysaten *in vitro* die natürlich in einer Zelle vorkommenden Prozesse der Transkription und Translation nachgeahmt werden. Als Stärken werden die Effizienz, geringe Komplexität und Offenheit des CF-Systems beschrieben (Dondapati *et al.*, 2020). Detergenzien können dem Reaktionsansatz zugefügt werden, um MPs kotranslational zu solubilisieren (Schwarz *et al.*, 2007). Eine Solubilisierung aus Biomembranen entfällt folglich. Zusätzlich adressiert es Schwierigkeiten, die in der heterologen Expression von MPs in zellulären Systemen häufig auftreten wie eine fehlende Translokation zur und Insertion in die Ziellmembran oder toxische Effekte auf die Wirtszelle. Zusammensetzung und Ansatzgröße können leicht an die Anforderungen des Anwenders angepasst werden (Schwarz *et al.*, 2007).

Tab. 1.2 Strukturen integraler und membranassoziierter Proteine aus *P. falciparum*.

Protein	Masse in kDa	Auflös. in Å	Expressionsorganismus	Methode	Referenz
Aquaglyceroporin (PfAQP)	113 (Tetramer)	2,1	<i>E. coli</i>	Kristallisation	Newby <i>et al.</i> (2008)
Dihydroorotat-Dehydrogenase (PfDHODH)	48	2,0	<i>E. coli</i>	Kristallisation	Deng <i>et al.</i> (2009)
Translokon für exportierte Proteine (PTEX)	1600 (Komplex)	4,2	<i>P. falciparum</i>	Kryo-EM	Ho <i>et al.</i> (2018)
Chloroquin-Resistenz-Transporter (PfCRT ^{7G8})	49*	3,2	HEK	Kryo-EM	Kim <i>et al.</i> (2019)
Hexose-Transporter (PfHT1)	112 (Dimer)	3,7	<i>S. cerevisiae</i>	Kristallisation	Qureshi <i>et al.</i> (2020)
Formiat-Nitrit-Transporter (PfFNT)	173 (Pentamer)	2,6	HEK	Kryo-EM	Lyu <i>et al.</i> (2021)

Bemerkung: * als Fab-Komplex ≈ 103 kDa

Das gestiegene Interesse an strukturellen Informationen potenzieller plasmodialer Wirkstoffziele zeigt sich ebenfalls in einer Zunahme der gelösten Strukturen von integralen Membranproteinen und membranassoziierten Enzymen aus *P. falciparum* (Tab. 1.2). Die Mehrzahl wurde rekombinant hergestellt und in den jüngsten Strukturen (< 5 Jahre) verzeichnet sich ein Trend zur elektronenmikroskopischen Strukturanalyse. Unter diesen veröffentlichten Strukturen befindet sich auch die einer als CQR klassifizierten PfCRT-Isoform (PfCRT^{7G8}) (Kim *et al.*, 2019). Diese bestätigt das von Martin und Kirk (2004) vorhergesagte Vorhandensein von 10 Transmembranhelices. Zusätzlich ist eine Juxtamembranhelix am zytosolischen N-Terminus sowie eine zwischen TM 7 und TM 8 vorhanden. Die TM 1 bis TM 4 und TM 6 bis TM 9 bilden eine zentrale Kavität mit einem maximalen Durchmesser von 25 Å, welche als Bindestelle für Liganden angenommen wird. Die vier Mutationen in der 7G8-Form inklusive der K76T-Mutation sind in dieser Kavität lokalisiert. Deren insgesamt negativ geladenes elektrostatisches Oberflächenpotenzial indiziert, dass die Substrate von PfCRT^{7G8} vermutlich positiv geladen sind. Kim *et al.* (2019) nehmen eine *inward-open*-Konformation an und befürworten eine Funktion als sekundär aktiver Carrier.

Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen

Strukturen können als Basis für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign dienen (SBDD, *structure-based drug design*; Klebe, 2009), so wie zum Beispiel die Kristallstrukturen der HIV-Protease und der Influenza-Neuraminidase als Basis für die Entwicklung neuer antiviraler Arzneistoffe dienen (Blundell *et al.*, 2006). Eine weitere Methode zu Wirkstoffentdeckung (*drug discovery*) ist die systematische Testung von Substanzbibliotheken, die aus Naturstoffen oder Synthetika bestehen können. Treffer (*hits*) können nach Überprüfung als Leitstrukturen für eine weitere Wirkstoffentwicklung dienen (Klebe, 2009). Die Ansätze zur Wirkstoffentdeckung werden in *target*-basierte und systembasierte eingeteilt (Eder *et al.*, 2014). *Target*-basierte Ansätze beruhen auf der Testung einer spezifischen Hypothese, bei der eine bekannte Zielstruktur im Mittelpunkt steht, deren Aktivität durch die Testung moduliert wird (Swinney & Anthony, 2011). Zu diesen gehören auch die SBDD-Methode. Eine systembasierte Wirkstoffentdeckung teilt sich in einen chemozentrischen Ansatz ein, welcher Substanzen bekannter Pharmakologie nutzt, sowie in einen phänotypischen Ansatz, welcher unbekannte Zielstrukturen adressiert (Eder *et al.*, 2014). In einem phänotypischen Screening werden Substanzen als *hits* identifiziert, die in einem biologischen System wie Zellen oder Tieren einen bestimmten Phänotyp, also bestimmte äußerlich beobachtbare Merkmale, hervorgerufen haben (Swinney, 2013). So wurden zum Beispiel Antibiotika häufig durch ihre wachstumsverzögernden oder abtötenden Eigenschaften gegenüber Bakterien identifiziert (Croston, 2017). Ein *target*-basierter Ansatz bestimmt zunehmend die Entwicklung neuer Arzneistoffe. Unter den 75 von 1999 bis 2009 bzw. 113 bis 2013 von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde zugelassenen Arzneistoffen mit einem neuen Wirkprinzip (*first-in-class drugs*) wurden 56 %

(Swinney & Anthony, 2011) bzw. 69 % (Eder *et al.*, 2014) *target*-basiert entdeckt, wenn Biologika in diese Kategorie eingeordnet werden. Betrachtet man nur die niedermolekularen Moleküle (*small molecules*) in den jeweiligen Zeiträumen so wurden 34 % (Swinney & Anthony, 2011) bzw. 40 % (Eder *et al.*, 2014) *target*-basiert entdeckt.

PfCRT: Ein potenzielles Wirkstoffziel in zweifacher Hinsicht

Aufgrund der bekannten Resistenzentwicklungen von Parasiten bei Monotherapien liegt die Zukunft der Malariabehandlung in Kombinationstherapien (White *et al.*, 1999). Neben der Kombination mit einem bereits etablierten Arzneistoff könnte auch ein *resistance reverser* eine erneute Selektion von CQR-Parasiten unterdrücken. Zu den bekannten *resistance reverser* gehören einige bereits etablierte Arzneistoffe wie Verapamil (Martin *et al.*, 1987) oder Desipramin (Bitonti *et al.*, 1988). Ihre therapeutische Breite oder ihre pharmakokinetischen Eigenschaften sowie die Tatsache, dass sie einen eigenständigen pharmakologischen Effekt im menschlichen Organismus hervorrufen, ermöglichen zurzeit noch keinen klinischen Einsatz *in vivo* (van Schalkwyk *et al.*, 2001; Ward & Bray, 2001). Neue *resistance reverser* werden folglich benötigt, die spezifisch den PfCRT adressieren.

Es ist in vielerlei Hinsicht erstrebenswert, CQ wieder einer effektiven Therapie zugänglich zu machen. Durch die lange und häufige Anwendung liegen viele Erfahrungswerte vor, sodass das Nebenwirkungsprofil bekannt ist und auch der Einsatz bei Kindern (Ursing *et al.*, 2016; Ursing *et al.*, 2020), Schwangeren und Stillenden als sicher bewertet wird (www.embryotox.de, o. D.). Ein weiterer wichtiger Faktor sind die sehr niedrigen Therapiekosten. CQ gehört mit der Antifolat-Kombination Sulfadoxin-Pyrimethamin zu den günstigsten Behandlungsoptionen (*Institute of Medicine of the National Academies*, 2004; Bloland, 2001). Eine CQ-Behandlung kostet nur etwa 10 US-amerikanische Cents (*Institute of Medicine of the National Academies*, 2004; Bloland, 2001, White, 2006) und ist etwa 10-20-mal günstiger als eine Artemisin basierte Kombinationstherapie (*Institute of Medicine of the National Academies*, 2004; Mutingwa, 2005). Die Erschwinglichkeit einer Therapie ist von großer Bedeutung angesichts einer überproportional in Armut lebenden Bevölkerung unter Risiko und mangelnder Ressourcen von staatlichen und nichtstaatlichen Hilfsprogrammen (Kouyaté *et al.*, 2007; Sachs & Malaney, 2002; WHO, 2020b).

Der Wirkmechanismus von CQ war über lange Zeit effektiv in der Abtötung von Plasmodien bei sich nur langsam ausbreitender Resistenzentwicklung. In ihrer Verdauungsvakuole degradieren Plasmodien humanes Hämoglobin (Goldberg *et al.*, 1990; Moulder & Evans, 1946). Aufgrund des reaktiven Eisens ist Häm toxisch für die Parasiten, sodass dieses nach Oxidation und Dimerisierung durch Kristallisation zu Hämozoin (Malariapigment) detoxifiziert wird (Kapishnikov *et al.*, 2017; Pagola *et al.*, 2000). Für CQ wurde gezeigt, dass es diesen Prozess durch Adsorption an die wachsende Kristalloberfläche inhibiert (Olafson *et al.*, 2015).

Darüber hinaus werden noch weitere Wirkmechanismen angenommen, da die Toxizität von CQ nicht stadienspezifisch ist (Gligorijevic *et al.*, 2008). Obgleich die Bedeutung der Hämoglobindegradation für den parasitären Aminosäurestoffwechsel kontrovers diskutiert wird (Krugliak *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006), werden diesem weitere Funktionen zugesprochen. Erst durch die Aufnahme erythrozytären Zytosols und den Verdau von Wirtsproteinen sollen sich die Parasiten den benötigte Raum für die Entwicklung innerhalb der Wirtszelle schaffen (Allen & Kirk, 2004; Krugliak *et al.*, 2002). Durch die genannten Prozesse trägt dies außerdem zum osmotischen Gleichgewicht in infizierten Erythrozyten bei, wodurch vermutlich eine vorzeitige Lyse der Wirtszellen verhindert und damit die vollständige Reifung der Parasiten ermöglicht wird (Lew *et al.*, 2003; Mauritz *et al.*, 2009). Die Verdauungsvakuole nimmt folglich eine wichtige Funktion in der Biologie der Plasmodien ein. Dies macht sie zu einem attraktiven Wirkort für einen pharmakologischen Eingriff durch CQ, aber auch den PfCRT zu einem potenziellen Wirkstoffziel. Eine vergrößerte Verdauungsvakuole von Dd2-Plasmodien (CQR) (Gligorijevic *et al.*, 2006) sowie von Plasmodien mit PfCRT^{3D7}-L272F deuten auf eine kritische Funktion für die Aufrechterhaltung des Vakuolenvolumens hin (Pulcini *et al.*, 2015). Dies wurde vor Kurzem durch die Veröffentlichung der physiologischen Substrate bestätigt (Shafik *et al.*, 2020). Der PfCRT soll vom Wirt stammende Peptide (4-11 Aminosäuren) zur weiteren Degradierung ins Zytosol transportieren und darüber auch osmotischen Stress in der Verdauungsvakuole verhindern (Shafik *et al.*, 2020). Darüber hinaus gehen die Mutationen in *pfcr*t mit Finesse einbußen für den Parasiten einher (Abdel-Muhsin *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2014; Ord *et al.*, 2007). Darauf deuten auch sinkende Prävalenzen von CQR-Parasiten nach Wechsel der Behandlungsstrategie und damit einhergehenden geringerem Selektionsdruck in einigen Regionen. Solche Berichte gibt es unter anderem von der chinesischen Insel Hainan (Liu *et al.*, 1995), aus Malawi (Kublin *et al.*, 2003), Kenia (Mang'era *et al.*, 2012; Wamae *et al.*, 2019) und der Elfenbeinküste (Dagnogo *et al.*, 2018). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass das *pfcr*t-Gen wichtig für die Viabilität der Parasiten ist. Versuche, das Gen auszuknocken und Knockdown-Klone zu kultivieren, schlugen fehl (Waller *et al.*, 2003). In *P. berghei*, dem Erreger der Malaria in Mäusen, wurde das Gen in einem *in vivo* phänotypischen Genomscreening als essenziell für das Parasitenwachstum identifiziert (Bushell *et al.*, 2017). Dies macht den PfCRT folglich zu einem eigenständigen, potenziellen Wirkstoffziel.

Wie für CQ ist auch für den antitrypanosomalen Arzneistoff Pentamidin die Akkumulation im Parasiten für dessen Effektivität entscheidend (De Koning, 2020). Im Gegensatz zu dem PfCRT vermittelten CQ-Export ist in *T. brucei* ein MP in eine Arzneistoffaufnahme involviert. Das Fehlen von der *T. brucei* Aquaglyceroporin-Isoform 2 (TbAQP2) in Knockout-Parasiten bewirkt eine Resistenz gegen Pentamidin (Baker *et al.*, 2012).

Dies wird im Folgenden näher erläutert, wobei auch kurz auf die aktuelle Situation zu resistenten Trypanosomen eingegangen wird.

1.4 Resistenzmechanismen von *T. brucei* und TbAQP2

Eine HAT-Behandlung orientiert sich am verursachenden Erreger sowie am Krankheitsstadium (WHO, 1998; WHO, 2019). Mit dem positiven Gutachten von der europäischen Arzneimittelbehörde wurde ein neuer Arzneistoff, Fexinidazol, in die WHO-Behandlungsempfehlungen für die *T. b. gambiense* HAT aufgenommen (Deeks, 2019; WHO, 2019). Bis auf Fexinidazol können die zur Verfügung stehenden Arzneistoffe nur in einem der beiden Stadien effektiv eingesetzt werden, da das zweite Stadium eine ausreichende Verfügbarkeit des Wirkstoffs im zentralen Nervensystem erfordert (WHO, 2019). Mit Ausnahme einer Melarsoprol-Resistenz und einer Melarsoprol-Pentamidin-Kreuzresistenz (MPXR) (Graf *et al.*, 2013) wurden noch keine effektiven Resistenzen in der Klinik beobachtet (Capela *et al.*, 2019). Für eine *T. b. gambiense* HAT stehen mit Fexinidazol (Deeks, 2019) sowie Nifurtimox in Kombination mit Eflornithin (WHO, 2009) genügend Alternativen für eine Behandlung des zweiten Stadiums zur Verfügung. Lediglich bei der *T. b. rhodesiense* HAT sieht die WHO noch eine Indikation für das hoch toxische, arsenhaltige Melarsoprol (WHO, 2013; WHO, 2019). Ein Therapieversagen lässt sich im Allgemeinen nicht eindeutig in einer Resistenz begründen, da eine Fehleinschätzung des Stadiums zu einer Behandlung mit einem inadäquaten Arzneistoff führt und somit Grund für ein Therapieversagen sein kann. Als Ursache für das seltene Auftreten von Resistenzen wird zudem diskutiert, dass mit Ausnahme von Eflornithin die zur Verfügung stehenden Arzneistoffe mehrere intrazelluläre Zielstrukturen adressieren, sodass die Entwicklung einer Resistenz über Mutationen oder die Expressionslevel erschwert wird (Capela *et al.*, 2019; Graf & Mäser, 2017). Des Weiteren wurden viele Patienten in der Vergangenheit für eine Behandlung hospitalisiert, wodurch sie nicht als Reservoir für die Tsetse-Fliege und somit für eine Resistenzverbreitung zur Verfügung standen (Graf & Mäser, 2017).

In Laborstudien wurden jedoch schon häufig resistente Parasiten selektiert (Baker *et al.*, 2012; Frommel & Balber, 1987; Rollo & Williamson, 1951; Vincent *et al.*, 2010; Yorke & Hawking, 1932). Als vorherrschender Resistenzmechanismus wurde eine verringerte Akkumulation durch einen fehlenden Import über parasitäre Proteine identifiziert. Selbst für Eflornithin, welches als Suizid-Inhibitor des Enzyms Ornithindecaboxylase eine spezifische Zielstruktur hat (Bacchi *et al.*, 1980; Metcalf *et al.*, 1978), wurde ein Aminosäure-Transporter identifiziert, der einen Import vermittelt und bei Fehlen *in vitro* eine Resistenz verursacht (Vincent *et al.*, 2010). Die beteiligten (Import-)Proteine für weitere antitrypanosomale Arzneistoffe wurden mit Hilfe von RNA-Interferenz-Screenings gefunden (Alsford *et al.*, 2012; Baker *et al.*, 2011; Schumann Burkard *et al.*, 2011). Dabei wurden Gene gezielt herunterreguliert, wodurch deren

Einfluss auf die Effektivität eines Arzneistoffs *in vitro* untersucht werden konnte. Es wurde gezeigt, dass das trypanosomale Aquaglyceroporin 2 (TbAQP2) maßgeblich für die Aufnahme von Pentamidin ist (Baker *et al.*, 2012), und ihm wurde die Funktion des zuvor genetisch undefinierten *high affinity pentamidine transporter* (HAPT1) zugesprochen (Munday *et al.*, 2014). In diesem Rahmen wurde das 340 Da schwere, aufgrund zweier basischer Amidin-Funktionen (pK_s 12,1) unter physiologischen Bedingungen zweifach protonierte Pentamidin auch als direktes Permeant von TbAQP2 vorgeschlagen (Baker *et al.*, 2012; Munday *et al.*, 2014). Dies stellt eine Abweichung von der Norm dar und hinterfragt das Prinzip der Selektivitätsfilter in dieser Proteinfamilie.

Das *Trypanosoma brucei* Aquaglyceroporin 2 (TbAQP2)

Das Genom von *Trypanosoma brucei* kodiert für drei Aquaglyceroporine, die Isoformen TbAQP1-3 (Uzcategui *et al.*, 2004). Aquaglyceroporine gehören zusammen mit den orthodoxen Aquaporinen zur ubiquitär vorkommenden Familie der Aquaporine, welche den *major intrinsic proteins* (MIP) zugeordnet werden (Park & Saier, 1996). Während orthodoxe AQPs Kanäle darstellen, die auf die erleichterte Diffusion von Wasser spezialisiert sind, vermitteln Aquaglyceroporine üblicherweise zusätzlich die Membranpassage von kleinen, ungeladenen Substraten (Wu & Beitz, 2007). Die Kanäle sind aus vier Protomer-Einheiten aufgebaut (Fu *et al.*, 2000). Jedes Protomer besteht aus sechs TMs und zwei Halbhelices, die zwischen der dritten und vierten TM eine Pseudo-TM ausbilden (Murata *et al.*, 2000).

Die Struktur der Aquaporine ähnelt einer Sanduhr, bei der eine etwa 20-28 Å lange Pore ein extra- und ein intrazelluläres Vestibül verbindet (Fu *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001). In der Pore bilden bestimmte konservierte Aminosäuremotive zwei Selektivitätsfilter aus. Am extrazellulären Poreneingang formen die Aminosäurereste des sogenannten aromatischen Arginin-Filters (ar/R) die engste Stelle in der Pore (Sui *et al.*, 2001), welche zu große Substratmoleküle (Fu *et al.*, 2000) und Protonen ausschließt (Beitz *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011). Dieses Motiv besteht aus einem positiv geladenen Argininrest in Umgebung von aromatischen Aminosäureresten (Fu *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001). Etwa im Zentrum der Pore befindet sich ein weiterer Kationenfilter, die sogenannte NPA-Region. Hier treffen die Enden zweier Halbhelices aufeinander, die in den meisten^{II} Aquaporinen und Aquaglyceroporinen jeweils eine konservierte Sequenz aus Asparagin, Alanin und Prolin (NPA) tragen (Zardoya, 2005). Durch die gegenüberliegenden Helix-Dipol-Momente wird ein ungünstiges elektrostatisches Feld für eine Kationenpassage aufgebaut (Li *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2009). Für dessen Funktion sind die Asparagin-Reste wesentlich (Wree *et al.*, 2011).

^{II} Etwa 95% der 463 von Zardoya *et al.* (2005) analysierten Sequenzen enthielten eine kanonische NPA-Sequenz.

Die drei TbAQP-Isoformen weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf (77 %), unterscheiden sich jedoch in den an der Porenausbildung beteiligten Selektivitätsfiltern (Uzcategui *et al.*, 2004). Anstelle des im TbAQP1 und TbAQP3 vorkommenden, kanonischen Arginin-Restes in aromatischer Umgebung befindet sich im ar/R-Filter von TbAQP2 ein neutraler Leucinrest (Leu264) in aliphatischer Umgebung (Ala88, Ile110, Val249, Leu258) (Abb. 1.6). Zusätzlich weist TbAQP2 im Gegensatz zu TbAQP1 und TbAQP3 ein nicht kanonisches Asparagin-Serin-Alanin- sowie Asparagin-Prolin-Serin-Motiv (NSA/NPS) im zweiten Selektivitätsfilter auf (Baker *et al.*, 2012; Uzcategui *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* und *X. laevis* Oozyten wurden die TbAQPs zuerst charakterisiert. Dabei zeigten sich Unterschiede in der Substratselektivität (Uzcategui *et al.*, 2004). Neben Wasser und Glycerol leiteten diese auch im unterschiedlichen Maße andere Polyole. Der Zuckeralkohol Ribitol ($C_5H_7(OH)_5$) passierte noch TbAQP2 und TbAQP3, nicht jedoch die zum Ribitol diastereomeren Zuckeralkohole Xylitol und Arabitol sowie solche mit längeren Kohlenstoffketten (Uzcategui *et al.*, 2004). Dies verdeutlicht die Filter-Funktion nach dem Größenausschlussprinzip und zeigt auch eine Stereoselektivität an. Weitere Substrate von TbAQP2 sind in Abb. 1.7 gezeigt. Unter diesen ist zum Größenvergleich auch Pentamidin gezeigt. Aufgrund der Abweichungen in der NPA-Region sowie des Fehlens eines kanonischen ar/R-Filters in der TbAQP2-Sequenz wurde die Intaktheit der Kationenfilter bezweifelt und ein größerer Porendurchmesser vermutet. Diese sollen eine direkte Passage des in Hinsicht der Ladung und Größe von den anderen Substraten abweichenden Pentamidins ermöglichen (Baker *et al.*, 2012; Munday *et al.*, 2014).

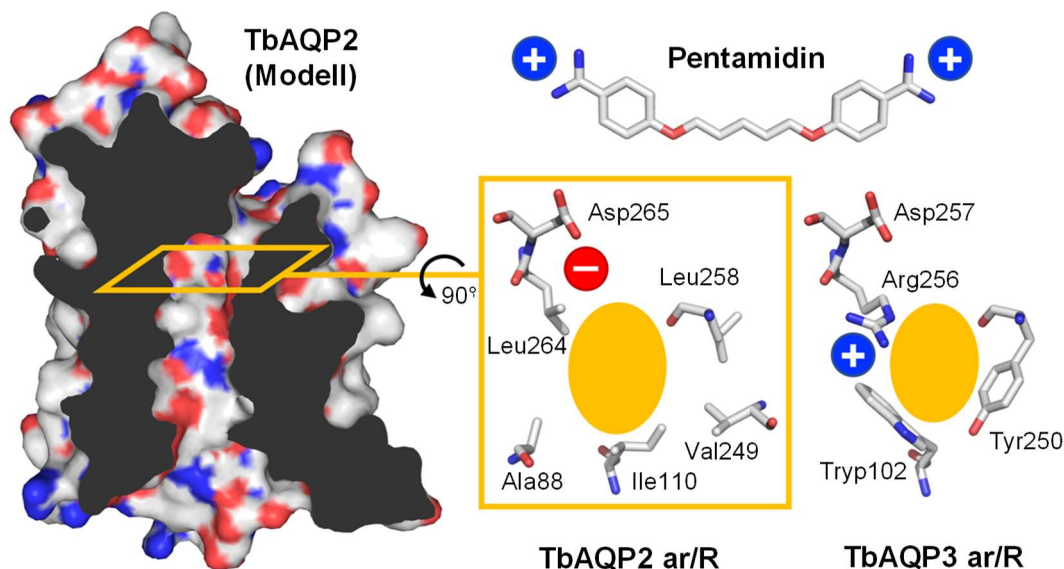


Abb. 1.6 Vergleich des aromatischen Arginin-Filters (ar/R) von TbAQP2 und TbAQP3 als Modelle auf Basis der Struktur des *E. coli* Aquaglyceroporins GlpF (PDB #1fx8). Die Ebene des ar/R-Filters im TbAQP2-Protomermmodell ist mit einem orangefarbenen Kasten markiert. Um 90° gedreht zeigt sie die Aufsicht in die Pore von der extrazellulären Seite. Die Filterregion sowie das Pentamidin-Molekül sind maßstabsgetreu dargestellt. Die Abbildung stellt eine modifizierte Abbildung der von Petersen und Beitz (2020) veröffentlichten Abbildung dar.

Obgleich es Beispiele für Aquaglyceroporine gibt, die die Aufnahme von Arzneistoffen vermitteln (Gourbal *et al.*, 2004), wäre eine direkte Passage von Pentamidin aufgrund der Molekülgröße und -ladung außergewöhnlich für ein Aquaglyceroporin. Pentamidin weicht damit von den anderen bestätigten Substraten ab, deren Spektrum nicht ungewöhnlich für ein Aquaglyceroporin ist (Rambow *et al.*, 2014; Wu & Beitz, 2007). Neben ungeladenen Molekülen sind auch schwache Säuren und Basen vertreten. Für diese wurde entweder eine pH-Abhängigkeit der TbAQP2-Permeabilität gezeigt (Song *et al.*, 2016; Uzcátegui *et al.*, 2013; Zeuthen *et al.*, 2006) oder aufgrund der Messbedingungen diskutiert, dass die Pore von der ungeladenen Form passiert wird (Uzcátegui *et al.*, 2018).

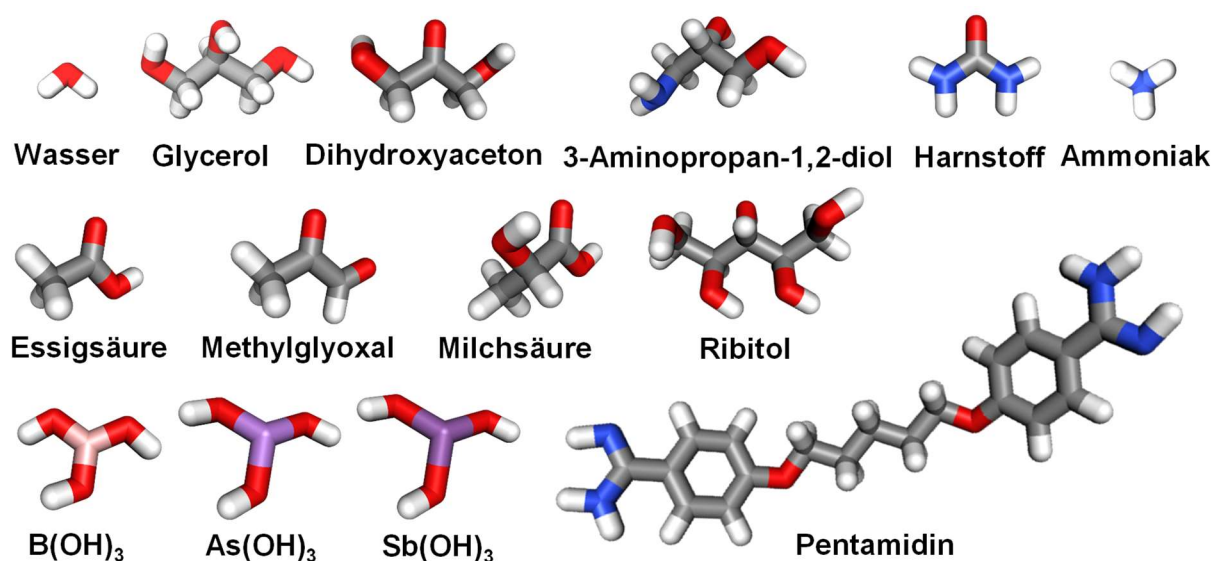


Abb. 1.7 Bestätigte und vermutete Substrate von TbAQP2. TbAQP2 leitet Wasser, Glycerol, Dihydroxyaceton, Harnstoff (Uzcátegui *et al.*, 2004), Essigsäure, Methylglyoxal, Milchsäure (Uzcátegui *et al.*, 2018), Borsäure (Marsicobetre *et al.*, 2017), As(OH)₃, Sb(OH)₃ (Uzcátegui *et al.*, 2013), Ammoniak (Zeuthen *et al.*, 2006) und Ribitol (Uzcátegui *et al.*, 2004). Pentamidin wird als Inhibitor (Song *et al.*, 2016) oder als direktes Permeant von TbAQP2 diskutiert (Baker *et al.*, 2012; Munday *et al.*, 2014). Die dreidimensionale Darstellung der Moleküle wurde mit *MolView* erstellt.

Die Exklusion von organischen Kationen wurde trotz veränderter Filterregionen für TbAQP2 mittels eines phänotypischen Assays und eines biophysikalischen Lichtstreuungsassays in *S. cerevisiae* gezeigt (Song *et al.*, 2016). TbAQP2 leitete Ammonium sowie bioisostere basische Stickstoffderivate von Glycerol und Harnstoff nicht oder pH-abhängig nur in ihrer ungeladenen Form. In dieser Studie zeigten Song *et al.* (2016) auch, dass Pentamidin ein nanomolarer Inhibitor der TbAQP2 vermittelten Glycerolpermeabilität ist. Da Trypanosomen mit einem TbAQP2-Knockout nicht in ihrem Wachstum eingeschränkt sind (Baker *et al.*, 2012), stellt diese Inhibition keinen potenziellen Wirkmechanismus von Pentamidin und damit TbAQP2 kein Wirkstoffziel dar (Song *et al.*, 2016). Da TbAQP2 jedoch als Eintrittspforte für Pentamidin in Trypanosomen gilt und Knockout-Stämme eine Resistenz zeigen, wurde von

Song *et al.* (2016) ein Aufnahmemechanismus analog zu einer rezeptorvermittelten Endozytose postuliert. TbAQP2 wird im Gegensatz zu den anderen Isoformen in der Flagellartasche von Blutform-Trypanosomen exprimiert, wie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen (Baker *et al.*, 2012). Die Flagellartasche ist der einzige Bereich der Trypanosomenoberfläche, in der Endozytose stattfindet, und dies mit hoher Aktivität (Coppens *et al.*, 1987; Engstler *et al.*, 2004; Webster & Griffiths, 1994). Ein einzelner Aminosäureaustausch in der Porenregion von TbAQP2 (L264R) bewirkt ein Ausbleiben der Inhibition im Hefesystem sowie eine Resistenz in Trypanosomen (Song *et al.*, 2016). Folglich postulieren Song *et al.* (2016), dass durch das Fehlen des Arginins im ar/R-Filter im TbAQP2 das negativ geladene Asp265 in der Pore exponiert wird, zu dem das dikationische Pentamidin eine Ionenbrücke aufbauen kann. Durch zusätzliche Verdrängung von Wasser aus der Pore führe dies zu der beobachteten hohen Affinität zu TbAQP2. Aufgrund der Lokalisation von TbAQP2 in der Flagellartasche wurde eine Internalisierung des TbAQP2-Pentamidin-Komplexes durch Endozytose vorgeschlagen. Eine Ansäuerung der Vesikel könnte die Bindung des Komplexes wieder schwächen und Pentamidin im Inneren der Trypanosomen freisetzen, da die Inhibition von TbAQP2 ebenfalls pH-abhängig ist (Song *et al.*, 2016). Der experimentelle Nachweis dieses Aufnahmemechanismus steht noch aus.

1.5 Zielsetzung

Der plasmodiale Chloroquin-Resistenz-Transporter (PfCRT) ist als molekularer Marker für eine CQ-Resistenz von Bedeutung und auch ein potenzielles Wirkstoffziel. Die Findung einer neuen Leitstruktur kann durch zwei Ansätze vorangetrieben werden, nämlich durch den Erhalt einer Struktur, welche für eine strukturbasierte Wirkstoffentdeckung genutzt werden könnte, sowie durch die systematische Testung einer antiplasmodial wirksamen Substanzbibliothek. Da zu Beginn der Arbeit noch keine Struktur bekannt war, wurde als erstes Ziel gesetzt, den PfCRT rekombinant in einem CF-System zu produzieren und zu reinigen, um das Protein einer Strukturaufklärung zugänglich zu machen. Als zweites Ziel sollte ein Assay entwickelt werden, der auf der PfCRT spezifischen Funktion basiert, CQ zu transportieren. Mit diesem sollte eine Bibliothek aus antiplasmodial wirksamen Substanzen, deren Zielstruktur unbekannt ist, nach ihrem PfCRT-Inhibitions Potenzial untersucht werden. Als drittes Ziel sollte der Aufnahmemechanismus von Pentamidin über TbAQP2 näher untersucht werden. Dazu sollte ein Pentamidin-Derivat hinsichtlich seiner Eignung für Lokalisationsstudien innerhalb von Trypanosomen untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss von Ionophoren auf die TbAQP2-Funktion evaluiert werden, da diese im Zusammenhang mit einer Abhängigkeit der TbAQP2 vermittelten Pentamidin-Aufnahme von dem Membranpotenzial oder einem Protonengradienten stehen (Alghamdi *et al.*, 2020; Alsford *et al.*, 2012; De Koning, 2001).

2 Material

2.1 Plasmide, kodierende DNA, Oligonukleotide und Zellstämme

Für die zellfreie Proteinproduktion wurden die Plasmide pIVEX2.3w_GFPΔM1 (Abb. 2.1) und pET-3a (Abb. 2.2) eingesetzt. Für die rekombinante Produktion in *S. cerevisiae* wurden die Plasmide pDRTXa (Abb. 2.3) beziehungsweise pHA_RS426Met25 (Abb. 2.4) verwendet. Die Vektorkarten wurden mit *SnapGene* (2.4, Software) erstellt.

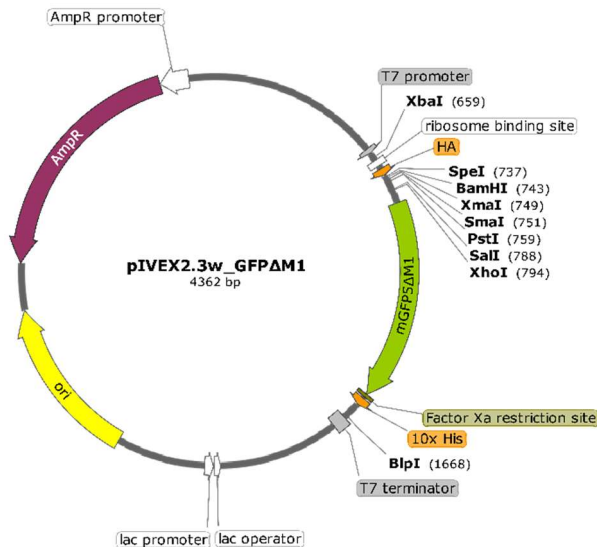


Abb. 2.1 Das Plasmid pIVEX2.3w_GFPΔM1 (Bock, 2014) für die zellfreie Produktion von GFP-Fusionsproteinen mit einem C-terminalen His₁₀-tag.

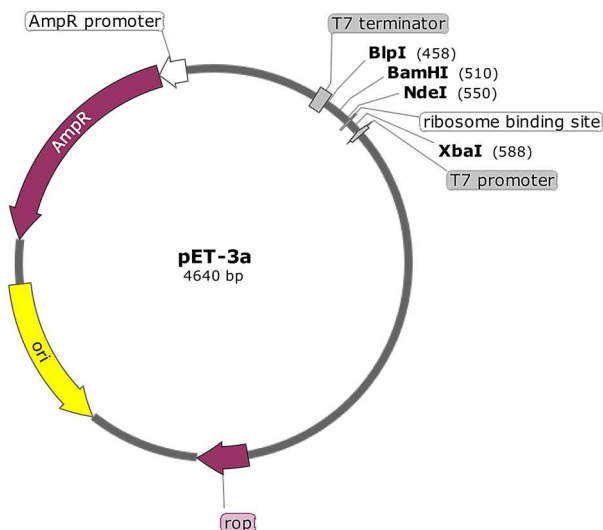


Abb. 2.2 Das Plasmid pET-3a für die zellfreie Produktion von Proteinen. Über die codonoptimierte Sequenz *opt_pfcrt* (siehe Anhang, 7.1) wurde eine Sequenz für einen C-terminalen His₁₀-tag eingefügt.

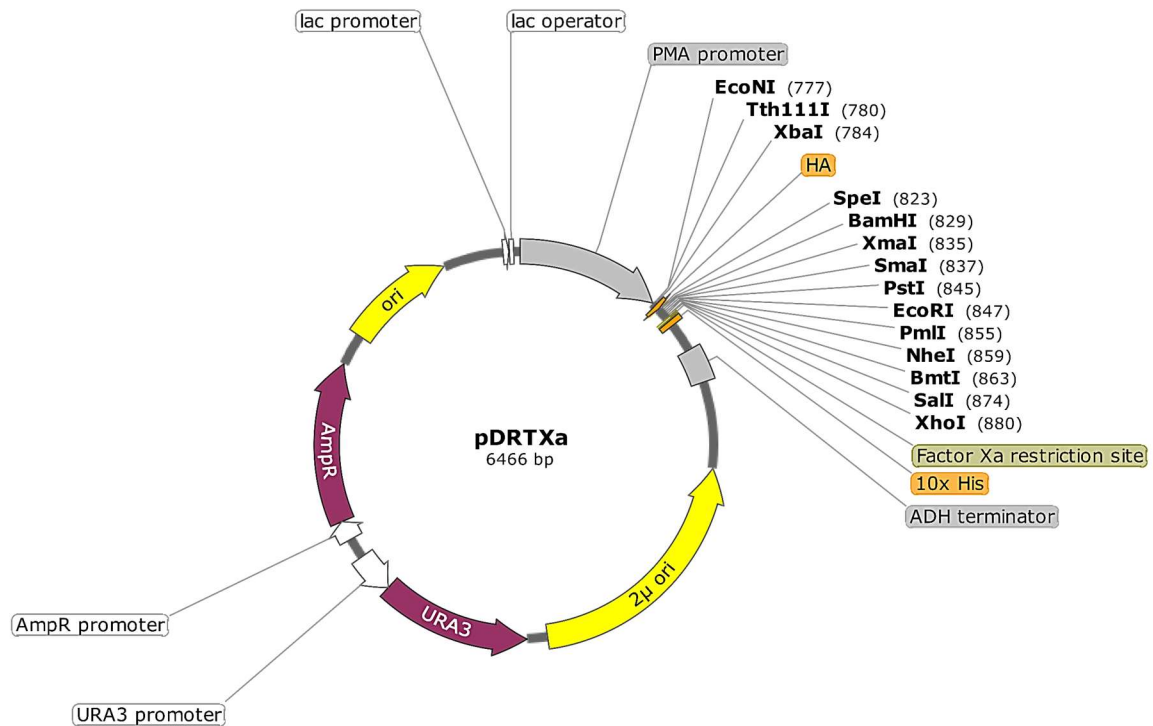


Abb. 2.3 Das Plasmid pDRTXa für die rekombinante Proteinproduktion in *S. cerevisiae* ist ein Derivat des Vektors pDR196 und beinhaltet zusätzlich einen Hämagglutinin- (HA) und einen His₁₀-tag sowie eine Faktor-Xa-Erkennungssequenz (Wu et al., 2015).

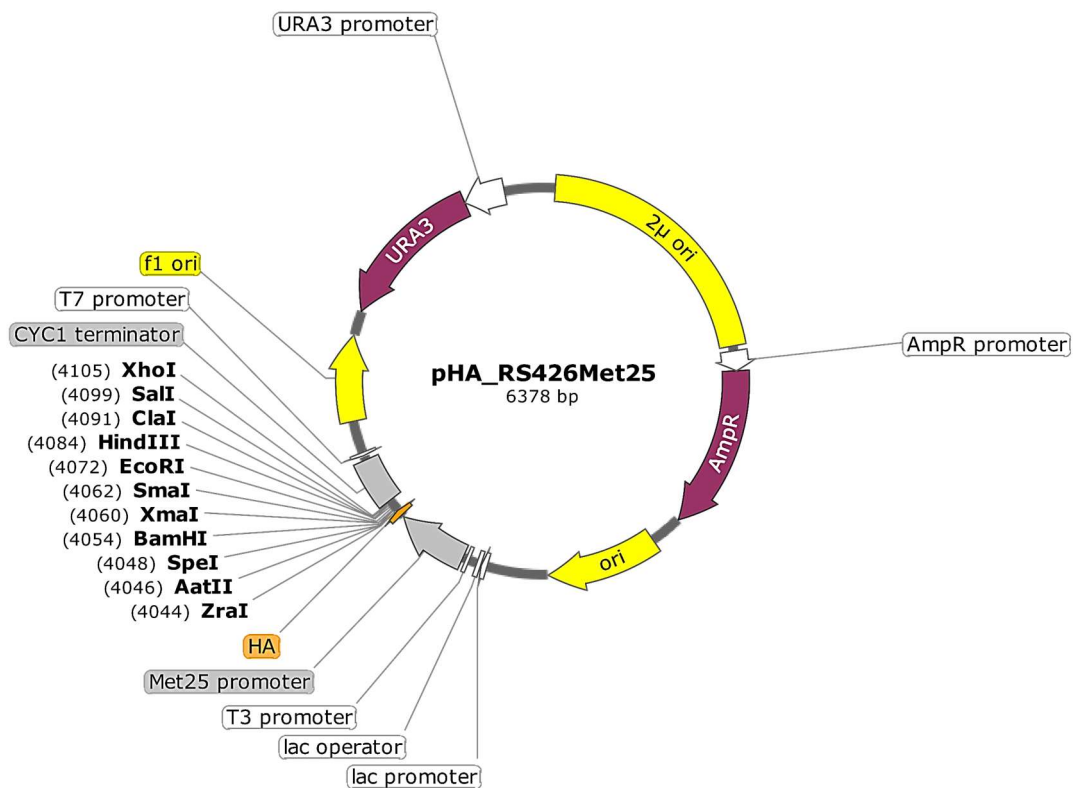


Abb. 2.4 Das Plasmid pHA_RS426Met25 für die rekombinante Proteinproduktion in *S. cerevisiae* ist ein Derivat des Vektors pRS426 mit einem Met25-Promoter und einem N-terminalen HA-tag.

Die Identifikationsnummern der Nukleotid- und Proteinsequenzen für die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Für eine optimale zellfreie Produktion auf Basis eines *E.-coli*-Systems wurde die für PfCRT^{3D7} kodierende DNA-Sequenz (PlasmoDB: PF3D7_070900) von Genscript (Piscataway, NJ, USA) mit Hilfe des *OptimumGene*TM-Algorithmus codonoptimiert. Durch ortsspezifische Mutagenese (3.1.7) wurde die für PfCRT^{Dd2} kodierende Sequenz schrittweise aufgebaut. Die Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (7.1).

Tab. 2.1 Kodierende DNA (NCBI GenBank®, Sayers et al., 2020).

Proteinname	Beschreibung	Nukleotid-ID	Protein-ID
PfCRT ^{3D7}	Chloroquin-Transporter aus <i>Plasmodium falciparum</i> (3D7)	siehe Anhang	CAD50842.1
PfCRT ^{Dd2}	Chloroquin-Transporter aus <i>P. falciparum</i> (Dd2)	siehe Anhang	AAF26926.1
TbAQP2	Aquaglyceroporin 2 aus <i>Trypanosoma brucei</i>	AJ697890.1	CAG27021.1
TbAQP3	Aquaglyceroporin 3 aus <i>Trypanosoma brucei</i>	AJ697891.1	CAG27022.1

Für eine Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen einer ortsspezifischen Mutagenese oder einer Sequenzierung wurden die in Tab. 2.2 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Von der komplementären Sequenz abweichende Triplets sind unterstrichen.

Tab. 2.2 Oligonukleotide für die ortsspezifische Mutagenese und die Sequenzierung.

Name	Sequenz
PMA 5'	CTC TCT TTT ATA CAC ACA TTC
ADH 3'	CAT AAA TCA TAA GAA ATT CGC
optPfCRT_K76T_fw	TG TGC GTT ATG AAC <u>ACG</u> ATT TTC GCG AAA C
optPfCRT_K76T_rv	CAT AAC GCA CAC GCT CAG GTA GAT GAT
optPfCRT_A220S_fw	TG GTG CTG ATT AGC <u>TCG</u> CTG A TC
optPfCRT_A220S_rv	GCA CCA GGT TGA AAA TGA TGC TGT TTT
optPfCRT_K76T_M74I_N75E_fw	CTG AGC GTG TGC GTT <u>ATA GAG ACG</u> ATT TTC GCG
optPfCRT_K76T_M74I_N75E_rv	GCA CAC GCT CAG GTA GAT GAT GCT CAG GAT
optPfCRT_Q271E_fw	TTC CTG AAG <u>GAA</u> CTG CAC CTG CCG TAT
optPfCRT_Q271E_rv	CTT CAG GAA CGG CAG GGT GTA AAC C
optPfCRT_N326S_fw	CTG TTT AGC TTC TTT <u>AGC</u> ATT TGC GAC AAC CT
optPfCRT_N326S_rv	AAA GAA GCT AAA CAG CGC GAA GGT TTT CCA
optPfCRT_I356T_fw	GGC CCG GCG <u>ACT</u> GCG ATC GCG TAC T
optPfCRT_I356T_rv	CCG GGC CCT GGA TGC AGC TCA CAA TGG TAT A
optPfCRT_R371I_fw	GGT GAC GTG GTT <u>ATT</u> GAA CCG CGT
optPfCRT_R371I_rv	AAC CAC GTC ACC CGC CAG AAA TTT GAA
optPfCRT_N113G_fw	AA CAA GAA AGG TAA TAG CAA AGA ACG TCA CC
optPfCRT_N113G_rv	CCT TTC TTG TTG <u>CCG</u> AAC AGG CTG TAA
optPfCRT_G186F_fw	C CTG TAC AAC TAT CTG <u>TTC</u> GCG GTG ATC ATT
optPfCRT_G186F_rv	GC <u>GAA</u> CAG ATA GTT GTA CAG GTG ATA ACG G
optPfCRT_G186L_fw	C CTG TAC AAC TAT CTG <u>CTC</u> GCG GTG ATC ATT
optPfCRT_G186L_rv	GC <u>GAG</u> CAG ATA GTT GTA CAG GTG ATA ACG G

Die Bakterienstämme für die Plasmidvermehrung und S30-Extrakt-Gewinnung sowie die Hefestämme für die funktionelle Untersuchung rekombinanter Proteine sind in Tab. 2.3 gelistet. Der Stamm W303-1AΔjen1Δady2 wurde von M. Casal zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.3 *E.-coli*- und *S.-cerevisiae*-Stämme.

<i>E. coli</i>	Genotyp
DH5α	F– ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK –, mK +) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ– <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>
BL21(DE3)	F– <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB–, mB–) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)
<i>S. cerevisiae</i>	Genotyp
BY4742Δ <i>fps1</i>	<i>MATa</i> <i>his3-1</i> <i>leu2</i> Δ <i>0</i> <i>lys2</i> Δ <i>0</i> <i>ura3</i> Δ <i>0</i> <i>fps1::KanMX4</i>
W303-1A	<i>MATa</i> <i>can1-100</i> <i>ade2-1</i> <i>his3-11, 15</i> <i>leu2-3, 112</i> <i>trp1-1</i> <i>ura3-1</i>
W303-1AΔjen1Δady2	<i>MATa</i> <i>can1-100</i> <i>ade2-1</i> <i>his3-11, 15</i> <i>leu2-3 112</i> , <i>trp1-1</i> <i>ura3-1</i> <i>jen1::KanMX4</i> <i>ady2::HphMX4</i>

2.2 Antikörper, Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Der S30-Extrakt und die T7-RNA-Polymerase für die zellfreie Proteinproduktion wurden in Anlehnung an das Protokoll von Schwarz *et al.* (2007) in der Arbeitsgruppe eigenproduziert. Die S30-Extrakte wurde in Zusammenarbeit mit weiteren Arbeitsgruppenmitgliedern aus BL21(DE3) *E. coli* gewonnen (3.3.1). T7-RNA-Polymerase wurde freundlicherweise von S. Bock, J. Holm-Bertelsen und F. Helmstetter zur Verfügung gestellt. Am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität (CAU) in Kiel verwendete Antikörper, Enzyme, Kits und Chemikalien sind im Folgenden nach ihrem Hersteller alphabetisch sortiert gelistet.

Antikörper

Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

Peroxidase AffiniPure IgG Goat Anti-Mouse, light chain specific (0,2 mg ml⁻¹, 1:5000),

Qiagen, Hilden

Anti-Penta-His, mouse, monoclonal (0,2 mg ml⁻¹, 1:5000)

Roche, Mannheim

Anti-Hämagglutin (Anti-HA), mouse, monoclonal (0,2 mg ml⁻¹, 1:5000)

Enzyme

Agilent Technologies, Waldbronn

PfuTurbo DNA-Polymerase (2,5 U μl⁻¹), *Pfu reaction buffer* (10x)

Carl Roth, Karlsruhe

Zymolyase-20T (≥ 20 U mg⁻¹)

Roche, Mannheim

Pyruvatkinase *from rabbit muscle* (10 mg ml⁻¹, ca. 200 U mg⁻¹)

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Restriktionsendonukleasen und Puffer, T4-DNA-Ligase (5 U µl⁻¹) und Puffer

Kits

Bio-Rad, München

ClarityTM Western ECL Substrate, Quick StartTM Bradford Protein Assay

Jena Bioscience, Jena

Membrane HTS96TM

Machery-Nagel, Düren

NucleoBond® PC 500

Molecular Dimensions, Suffolk, UK

MemGold2TM

Promega, Mannheim

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Süd-Laborbedarf, Gauting

HiYield® PCR Clean-up/Gel Extraction

Chemikalien

Anatrace, Maumee, USA

5-Cyclohexyl-1-pentyl-β-D-maltosid (Cymal-5) ANAGRADE, *n*-Dodecyl-β-D-maltopyranosid (DDM) ANAGRADE, *n*-Decyl-β-D-maltopyranosid (DM) ANAGRADE, 2,2-Didecylpropan-1,3-bis-β-D-maltopyranosid (LMNG), *n*-Dodecyl-*N,N*-dimethylamin-*N*-oxid (LDAO) ANAGRADE, *n*-Dodecylphosphochlin (Foscholin-12, FCH-12) ANAGRADE, *n*-Octyl-β-D-glucopyranosid (β-OG) ANAGRADE

AppliChem, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS), Phosphoenolpyruvat (Kaliumsalz), Tween® 20

Becton Dickinson, Heidelberg

BactoTM Peptone, BactoTM Yeast Extract, DifoTM Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate

Carl Roth, Karlsruhe

Ammoniumperoxodisulfat (APS, (NH₄)₂S₂O₈), Bromphenolblau (Natriumsalz), Calciumchlorid (CaCl₂ · 2 H₂O), Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄, ≥ 99,5 %), Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethanol (≥ 99,8 %), Glycerol ROTIPURAN® (≥ 99,5 %, wasserfrei), Glycin, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure (HEPES), Isopropanol (≥ 99,8 %), Kaliumacetat, Kaliumchlorid

(KCl), Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), Kaliumhydroxid (KOH), Kieselgel 60, LB-Agar (Lennox), LB-Medium (Lennox), L-Leucin, Lithiumacetat, 2-Mercaptoethanol, Milchpulver (*blotting grade*, fettarm), 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS, PUFFERAN®, $\geq 99,5\%$), Natriumazid (NaN_3), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), Natriumhydroxid (NaOH), Orange G, L-Prolin, *Rotiphorese*® Gel 40 (40 %, 29:1), *Rotiphorese*® Blau R (Konzentrat), D(+)-Saccharose ($\geq 99,5\%$), Triton™ X-100, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

L-Alanin, L-Glutamat (Kalium-Monohydratsalz), L-Serin,

Genaxxon bioscience, Ulm

Ampicillin (Natriumsalz), Agarose LE, *Bovine Albumin Fraktion V* (pH 7,0) (*bovine serum albumin*, BSA), *N,N,N',N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)

J.T. Baker, München

Essigsäure, Methanol (*HPLC grade*), Salzsäure

Knoll, Ludwigshafen

Verapamil (VP, Hydrochloridsalz)

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

Oxoid, Basingstoke, UK

Bakteriologischer Agar

Peqlab, Erlangen

peqGOLD Protein Marker III (*prestained*)

Qiagen, Hilden

Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni^{2+} -NTA)

Roche, Mannheim

cOmplete™-Proteaseinhibitor-Cocktail (EDTA-frei), Transfer-DNA aus *E. coli* MRE600 (*E. coli* tRNA)

Sigma Aldrich, München

Acetylphosphat (Lithium-Kaliumsalz), Adenosin-5'-triphosphat (ATP, Dinatriumsalz), L-Arginin (Hydrochloridsalz), L-Asparagin (Monohydrat), L-Aspartat (Natrium-Monohydratsalz), Brij® 78, Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP), Chloroquin (CQ, Diphosphatsalz), L-Cystein, Cytidin-5'-triphosphat (CTP, Dinatriumsalz), Desoxyribonukleinsäure aus Lachssperma (SS-DNA, Natriumsalz), Dimethylsulfoxid (DMSO, $\geq 99,8\%$), Folinsäure (Calciumsalz), L-Glutamin, Gramicidin (Mischung aus Gramicidin A, B, C, und D aus *Bacillus aneurinolyticus*), Guanosin-5'-triphosphat (GTP, Natriumsalz), L-Histidin (Hydrochlorid-Monohydratsalz), Imidazol, L-Isoleucin, L-Lysin

(Hydrochloridsalz), Magnesiumacetat (Tetrahydratsalz), L-Methionin, Nigericin ($\geq 98\%$, Natriumsalz aus *Streptomyces hygroscopicus*), L-Phenylalanin, Pentamidin (Isethionatsalz), Polyethylenglykol 3350, Polyethylenglykol 8000, Polypropylenglykol 2000, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, Uridin-5'-triphosphat (UTP, Trinatriumsalz), L-Valin

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP, 100 mM), 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP, 100 mM), 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP, 100 mM), 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP, 100 mM), Lambda-DNA, *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*, *RiboLock* RNase-Inhibitor (40 U μl^{-1})

Verbrauchsmaterialien

Beckmann Coulter, Krefeld

Ultrazentrifugengefäß (1,5 ml, PP)

Bemis, Neenah, USA

Parafilm® M

Bio-Rad, München

Poly-Prep® Chromatography Columns (2 ml Säulenvolumen, 10 ml Reservoir)

Carl Roth, Karlsruhe

Dialyseschlauch *Visking®* (14k MWCO)

Eydam, Kiel

Einmalspritzen *NORM-JECT®*

Fisher Scientific, Schwerte

Honeycomb 100-well-Platten, *Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassettes* (10k MWCO, 3 ml)

GE Healthcare, Freiburg

Amersham™ Hybond™ 0.45 PVDF, *Whatman® Grade 3 MM Chr Blotting Paper*

Hellma, Jena

Quarzküvette (10 mm)

Henke-Sass Wolf, Tuttlingen

Einmalkanülen (21G, 0,8 x 40 mm)

Merck, Darmstadt

Zentrifugierfiltereinheiten *Amicon® Ultra-4*, *Ultra-15* (je *Ultracel-100* und *Ultracel-30*)

Sarstedt, Nümbrecht

Mikroreagiergefäße, PCR-Reagiergefäß *Multiply®-Pro* (0,2 ml, PP), PCR-Streifen (*8-strip opt. clear flat caps*), Pipettenspitzen, Polystyrol-Küvetten (10 x 4 x 45 mm), Reagenz- und Zentrifugenröhrchen, Serologische Pipetten, Sterilfilter *Filtropur S* ($\varnothing 0,2\ \mu\text{m}$)

Schott Instruments, Mainz

Glasbehälter und -kolben

Sigma Aldrich, München

Glaskügelchen, (säuregewaschen, Ø 425-600 µm)

2.3 Nährmedien, Lösungen & Puffer

Nährmedien für *E. coli* und *S. cerevisiae*

Alle Nährmedien wurden nach der Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert. Zusätze zur Selektion wurde bei einer Autoklavierung erst nach dem Abkühlen hinzugefügt.

Nährmedien für *E. coli*:

LB

20 g LB-Medium
1 l *Aqua bidest.*

LB-Agarplatten

35 g LB-Agar
1 l *Aqua bidest.*

Als Selektionsmarker wurden ggf. 100 µg ml⁻¹ Ampicillin hinzugefügt.

Nährmedien für *S. cerevisiae*:

YPD

20 g Pepton
10 g Hefeextrakt
20 g Glukose
1 l *Aqua bidest.*

SD-KHL

1 l SD-Medium, pH 5,6
20 mg ml⁻¹ L-Lysin
20 mg ml⁻¹ L-Histidin
100 mg ml⁻¹ L-Leucin

SD

1,7 g YNP
5 g Ammoniumsulfat
20 g Glukose
ad 1 l *Aqua bidest.*, pH 5,6

SD-AHLW

1 l SD-Medium, pH 5,6
25 mg ml⁻¹ Adenin
20 mg ml⁻¹ L-Histidin
100 mg ml⁻¹ L-Leucin
10 mg ml⁻¹ L-Tryptophan

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

Lösungen für die Molekularbiologie und Proteinbiochemie

Agarosegelelektrophorese von DNA:

TAE-Puffer		Probenpuffer (10x)	
40 mM	TRIS-Acetat, pH 8,0	0,4 %	Orange G
1 mM	EDTA	30 %	Glycerol

Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹)

1 Tabl.	Ethidiumbromid
10 ml	<i>Aqua bidest.</i>

Transformation von *S. cerevisiae*:

Transformationslösung

240 µl	Polyethylenglykol 3500, 50 % (m/V)
36 µl	Lithiumacetat (1,0 M)
50 µl	SS-DNA
34 µl	<i>Aqua bidest.</i>

Die bei –20 °C gelagerte SS-DNA wurde vor der Verwendung für 5 min bei 100 °C erhitzt.

Puffer für die Membranproteinpräparation aus *S. cerevisiae*:

Extraktionspuffer		Lagerungspuffer	
25 mM	TRIS	100 mM	Na ₂ HPO ₄ (1 M)
5 mM	EDTA	50 mM	NaCl
pH 7,5 mit HCl, autoklavieren		pH 8 mit HCl, autoklavieren	

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE):

Trenngel (12 %)		Sammelgel (5 %)	
2625 µl	<i>Aqua bidest.</i>	1200 µl	<i>Aqua bidest.</i>
1500 µl	Trenngelpuffer (4x)	500 µl	Sammelgelpuffer (4x)
1875 µl	<i>Rotiphorese</i> ® 40	300 µl	<i>Rotiphorese</i> ® 40
5 µl	TEMED	3 µl	TEMED
40 µl	APS (10 %)	12,5 µl	APS (10 %)

Trenngelpuffer (4x)

1,5 M TRIS
0,4 % SDS
pH 8,8 mit HCl

APS (10 %)

5 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
Ad 50 ml *Aqua bidest.*
Aliquotiert bei -20°C lagern

Sammelgelpuffer (4x)

0,5 M TRIS
0,4 % SDS
pH 6,8 mit HCl

Kathodenpuffer

2,5 mM TRIS
19,2 mM Glycin
0,1 % SDS
pH 8,2-8,6 mit HCl

SDS-Ladepuffer (4x)

250 mM TRIS
40 % Glycerol
0,02 % Bromphenolblau
8 % SDS
400 mM DTT
pH 6,8 mit HCl

Western Blot:

Transferpuffer (5x)

12,5 mM TRIS
96 mM Glycin
0,2 % SDS
pH 8,3 mit HCl

Transferpuffer

10 ml Transferpuffer (5x)
10 ml Methanol
Ad 50 ml *Aqua bidest.*

TBS (10x)

0,2 M TRIS
1,35 M NaCl
Ad 1 l *Aqua bidest.*
pH 7,6 mit HCl

TBST

100 ml TBS (10x)
1 ml Tween® 20

MTBST

1,2 g Milchpulver
Ad 40 ml TBST

Medien, Lösungen und Puffer für die Produktion und Reinigung zellfreier Proteine

Nährmedien und Puffer für die S30-Extrakt-Herstellung:

Mit Ausnahme der Aminosäurelösung und des Phosphatpuffers für das YPTG-Medium, welche jeweils im Rahmen der S30-Extrakt-Herstellung zusammen mit dem Bioreaktor autoklaviert wurden, wurden die hier aufgeführten Lösungen filtriert (\varnothing 2 μ m).

YPTG-Aminosäuren

80 g	Bactotrypton
25 g	NaCl
50 g	<i>Bacto-Yeast-Extract</i>
Ad 4,5 l	<i>Aqua bidest.</i>

YPTG-Glukose

99 g	Glukose-Monohydrat
Ad 200 ml	<i>Aqua bidest.</i>

YPTG-Phosphatpuffer

14,95 g	KH ₂ PO ₄
45,65 g	K ₂ HPO ₄
Ad 250 ml	<i>Aqua bidest.</i>

Die S30-Puffer A, B und C wurden durch Verdünnen der hier aufgeführten 50-fachen Stammlösungen mit *Aqua bidest.* um den Faktor 50 erhalten. Außerdem wurden 0,042 % 2-Mercaptoethanol (Puffer A), 0,05 % DDT (2 M) (Puffer B) beziehungsweise 0,025 % DTT (2 M) (Puffer C) vor Verwendung hinzugefügt.

S30-Puffer A/B (50x)

500 mM	TRIS
30 mM	KCl
700 mM	Magnesiumacetat
pH 8,2	mit Essigsäure

S30-Puffer C (50x)

500 mM	TRIS
30 mM	Kaliumacetat
700 mM	Magnesiumacetat
pH 8,2	mit Essigsäure

Lösungen für die zellfreie Proteinsynthese:

S30-Puffer

10 mM	TRIS
14 mM	Magnesiumacetat
0,6 mM	KCl
Filtrieren	\varnothing 2 μ m
Bei 4 °C lagern	

HEPES/EDTA-Puffer (24x)

2,4 M	HEPES, pH 8,0
20 mM	EDTA
Filtrieren	\varnothing 2 μ m
Bei -20 °C lagern	

cOmplete™ (50x)

1 Minitablette *cOmplete™*
 1 ml *Aqua bidest.*
 Bei -20 °C lagern

RCWMDE

Je 16,7 mM: L-Arginin, L-Cystein,
 L-Tryptophan, L-Methionin,
 L-Asparaginsäure,
 L-Glutaminsäure

NTP-Mix (75x)

90 mM ATP
 Je 60 mM GTP, CTP, UTP
 Filtrieren Ø 2 µm
 Bei -20 °C lagern

Bei -20 °C lagern

Aminosäure-Mix (50x)

Je 4 mM: L-Arginin, L-Asparagin, L-Alanin, L-Aspartat, L-Cystein, L-Glutamat,
 L-Glutamin, Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin,
 L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin,
 L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Valin
 Bei -20 °C lagern

Proteinreinigung an Ni²⁺-NTA-Agarose:

Die genaue Zusammensetzung des TRIS-Puffers ist bei der jeweiligen Nennung in der Arbeit aufgeführt. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes von TRIS-Puffern wurde dieser bei Raumtemperatur auf pH 7,4 eingestellt. Für die Proteinreinigung bei 4°C wird so ein pH von 8 erzielt (Newby *et al.*, 2009).

TRIS-Puffer

20 mM TRIS
 100-1000 mM NaCl
 0-10 % Glycerol
 0-500 mM Imidazol
 + verschiedene Detergenzien
 pH 7,4 mit HCl

Puffer für die funktionelle Proteincharakterisierung in *S. cerevisiae*

Protoplastierung von *S. cerevisiae*:

Protoplastierungspuffer		Aufbewahrungspuffer	
50 mM	MOPS, pH 7,2	10 mM	MOPS, pH 7,2
1,8 M	Saccharose	1,2 M	Saccharose
Filtrieren	Ø 2 µm	50 mM	NaCl
+ 0,2 %	2-Mercaptoethanol	5 mM	CaCl ₂
		Filtrieren	Ø 2 µm

Assaypuffer für *Stopped-Flow*-Lichtstreuungsmessungen:

Hyperosmotischer Assaypuffer		Isoosmotischer Assaypuffer	
10 mM	MOPS, pH 7,2	10 mM	MOPS, pH 7,2
1,2 M	Saccharose	0,6 M	Saccharose
0,6 M	Glycerol	0,6 M	Glycerol
50 mM	NaCl	50 mM	NaCl
5 mM	CaCl ₂	5 mM	CaCl ₂
Filtrieren	Ø 2 µm	Filtrieren	Ø 2 µm

2.4 Geräte & Software

Geräte

Agarosegelelektrophorese und Dokumentation:

<i>IDA Image Documentation & Analysis</i>	Raytest, Straubenhardt
Mikrowelle <i>NN-E245W</i>	Panasonic, Wiesbaden
Netzgerät <i>EPS 300</i>	Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz
UV-Transilluminator	Herolab, Wiesloch

Automatisierte Trübungsmessung:

Oy Growth Curves, Helsinki, Finnland

Bioscreen C, Halogenlampen 8 V 50 W for *Bioscreen C*

Brutschränke & temperierbare Geräte:

Brutschrank <i>Kelvitron® T</i>	Heraeus, Hanau
Brutschrank <i>Minitron</i>	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
Heizblock <i>DRI-BLOCK DB-20</i>	Techne, Cambridge, UK
Thermozykler <i>Primus</i>	Peqlab, Erlangen

Größenausschlusschromatographie (SEC): GE Healthcare, Freiburg
 SEC-System ÄKTApurifier, Flow-cell 10 mm, Fraktionssammler Frac-950,
 Kontrolleinheit U-950, Detektor UV-900, Mischeinheit M-925, Pumpe P-903, Ventil INV-
 907, Säule SuperdexTM 200 10/300 GL, Säule SuperoseTM 6 Increase 10/300 GL

Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC):
 HPLC-System Agilent 1260 Agilent Technologies, Waldbronn
 Säule Xterra MS C8, 4,6 x 50 mm, 3,5 µm Waters, Eschborn
 Vorsäule Security Guard C18 Phenomenex, Aschaffenburg

Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC): Labomatic Instruments, Effringen-Kirchen
 Steuereinheit Labomat VS-200, Mitteldruck-Kolbenpumpe MD-80/100, Druck-Mess-
 Begrenzer MB-10, Pulsationsdämpfer MDP-20, UV-Spektralphotometer Labocord-200,
 Chromatographiesäule Labochrom MPGC
 Flachbrettschreiber BD 40 04 Kipp & Zonen, Delft, Niederlanden

Mischer und Schüttler:
 Kolben-Orbitalschüttler Certomat ® MO II Sartorius, Göttingen
 Rotationsmischer für Reagenzgläser TC-7 New Brunswick Scientific, Edison, USA
 Rotator-Mixer Grant-bio PTR-30 Grant Instruments, Shepreth, UK
 Vortex-Genie 2 Scientific Industries, Bohemia, USA
 Wippschüttler WS 10 Edmund Bühler, Hechingen

NMR- und MS-Analytik:
 Bruker Avance III 300 Bruker Biospin, Rheinstetten
 Bruker Amazon SL Bruker Daltonics, Bremen

S30-Extrakt-Produktion:
 BIOSTAT® A plus Sartorius, Göttingen
 French Press cell disrupter FA-078 Thermo Fisher Scientific, Schwerte
 Wasserbad 183 GFL, Burgwedel

SDS-PAGE & Western Blot:
 Gelgießstand und Laufkammer Peqlab, Erlangen
 Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell Bio-Rad, München
 Lumi ImagerTM F1 Roche Diagnostics, Mannheim
 ECL Chemostar Intas Science Imaging, Göttingen

Stopped-Flow-Apparatur:

Jasco, Groß-Umstadt

Küvette *FC-15/7.5*, Mischeinheit *SFM-2000*, Monochromator *BH-10-61 UV*, *MPS 70/2 microcompressor unit*, *PCI connector block 6221*, Photomultiplier *PMS 250*, Spannungsquelle *ALX 250*, UV/Vis- und Fluoreszenzspektrometer *MOS-200*

Zentrifugen:

Ultrazentrifuge *Optima™ XL-80K*

Beckman Coulter, Krefeld

Ultrazentrifugen-Rotor *50.2 Ti*

Beckman Coulter, Krefeld

Multifuge 1S-R Centrifuge

Heraeus, Hanau

PerfectSpin 24 Plus

Peqlab, Erlangen

Perfect Spin 24 R refrigerated

Peqlab, Erlangen

micocentrifuge

Sonstiges:

BioPhotometer

Eppendorf, Hamburg

Digital-pH-Meter *Lab 850*

Schott Instruments, Mainz

Software

Bio-Kine Version 4.74.2

BioLogic, Claix, Frankreich

BioPAT® MCFS/DA Version 3.0

Sartorius, Göttingen

ChemDraw Professional V. 15.1.0.144

Perkin Elmer, Waltham, MA, US

Cn3D Version 4.3.1 (Wang *et al.*, 2000)

National Center for Biotechnology

Information (NCBI), Bethesda, MD, US

Microsoft Office Version 2008

Microsoft Corporation, Redmond, WA, US

MolView v2.4

Bergswerf (o. D.)

SigmaPlot for Windows Version 11.0

Systat Software, Erkrath

SnapGene Viewer Version 5.1.5

Insightful Sciene, GSL Biotech, San Diego, CA, US

Unicorn Version 5.2

GE Healthcare, Freiburg

3 Methoden

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Zentrifugationsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, unter Verwendung eines Festwinkelmotors durchgeführt.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*

Herstellung kompetenter *E. coli*

Für die Herstellung kompetenter *Escherichia coli* vom Stamm DH5 α wurde eine Dauerkultur der Zelllinie auf einer LB-Agarplatte bei 37 °C über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml LB mit einer Kolonie inokuliert und für 8-9 h bei 37 °C rotierend inkubiert. Abends wurden 100 ml LB mit dieser Vorkultur angeimpft und in einem ausreichend großen Erlenmeyerkolben auf einem Orbitalschüttler bei 200 rpm und 20 °C über Nacht inkubiert. Bei Erreichen der optischen Dichte bei $\lambda = 600$ nm (OD_{600}) von 0,4-0,6 wurden die Zellen vor der Zellernte 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellernte erfolgte dann durch Zentrifugation für 10 min bei 2.000 g und 4 °C. Das Zellpellet wurde zweimal mit kalter Calciumchlorid-Lösung (0,1 M) für 20 min auf Eis inkubiert. Dabei wurden die Zellen beim ersten Inkubationsschritt in 15 ml suspendiert und nach erneutem Pelletieren beim zweiten Inkubationsschritt in 10 ml der Calciumchlorid-Lösung suspendiert. Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation wieder gesammelt, in 5 ml der mit 20 % Glycerol versetzten Calciumchlorid-Lösung aufgenommen und nach mindestens vierständiger Inkubation auf Eis zu je 100 μ l aliquotiert. Kompetente *E. coli* wurden bei –80 °C gelagert.

Transformation von *E. coli*

Zur Aufnahme von doppelsträngiger DNA wurden mit der Calciumchlorid-Methode chemisch kompetent gemachte DH5 α *E. coli* (3.1.1) verwendet, die je nach verwendeter DNA zusätzlich einem Hitzeschock ausgesetzt wurden, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Die bei –80 °C gelagerten kompetenten DH5 α *E. coli* wurden für 2-5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10 μ l Plasmid aus einem Ligationsansatz (3.1.6), 5 μ l gereinigtes PCR-Produkt aus einem ortsspezifischen Mutagenese-Ansatz (3.1.7) oder 100-200 ng Plasmid (3.1.3) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 20-30 min auf Eis inkubiert. Für Ansätze mit Plasmiden, die aus einer Minipräparation stammten, entfiel der nachfolgende Hitzeschock von 45 s bei 42 °C und es wurden nach vorheriger Mischung auf einem Vortex-Mischer direkt 40 μ l des Ansatzes auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Andernfalls wurden die Ansätze nach dem Hitzeschock 2 min auf Eis gekühlt, mit 900 μ l LB versetzt und für 45-60 min bei 37 °C rotierend (6 rpm) inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 s bei bis zu 18.000 *g* pelletiert. Nach Entfernen von 900 µl des Überstandes wurden die Zellen im restlichen Überstand resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wurde auf einer LB-Amp-Agarplatte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für die Anlegung von Dauerkulturen wurden 1 ml einer Übernachtskultur einer einzelnen Kolonie mit 0,5 ml autoklaviertem Glycerol 80 % versetzt und nach Mischen auf dem *Vortex*-Mischer anschließend bei –80 °C gelagert.

3.1.2 Transformation von *S. cerevisiae*

In Anlehnung an die Lithium-Acetat-Methode von Gietz & Woods (2002) wurde *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe eines Hitzeschocks in Anwesenheit von Lithium-Acetat, Polyethylenglykol und SS-DNA durch die Aufnahme doppelsträngiger Plasmide transformiert. Der zu transformierende Hefestamm wurde auf einer YPD-Agarplatte bei 29 °C kultiviert. 5 ml YPD wurden mit einer Kolonie inokuliert und auf einem Orbitalschüttler mit Reagenzglas-aufsatz bei 200 rpm und 29 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml YPD in einem Erlenmeyerkolben mit dieser Vorkultur angeimpft, sodass eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt wurde. Es wurde ein Erlenmeyerkolben verwendet, dessen Füllvolumen vier- bis sechsmal größer war als das Volumen der Kultur. Bis zum Erreichen der Ziel-OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Kultur auf einem Orbitalschüttler bei 200 rpm und 29 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 4.000 *g* und 4 °C geerntet, einmal mit 25 ml sowie einmal mit 1 ml autoklaviertem *Aqua bidest.* gewaschen, bevor sie in 1 ml autoklaviertem *Aqua bidest.* resuspendiert wurden. Für einen Transformationsansatz wurden 100 µl dieser Zellsuspension durch Zentrifugation für 30 s bei bis zu 18.000 *g* und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet anschließend mit 360 µl der Transformationslösung (2.3) sowie mit 0,5 µl Plasmid-DNA versetzt. Nach Mischen auf einem *Vortex*-Mischer und Inkubation für 45-60 min bei 42 °C wurden die transformierten Zellen durch Zentrifugation für 30 s bei bis zu 18.000 *g* und 4 °C geerntet und in 1 ml autoklaviertem *Aqua bidest.* resuspendiert. 100-200 µl verschiedener Verdünnungen (1:10, 1:25, 1:100) dieser Zellsuspension wurden auf SD-Agarplatten mit Selektionszusätzen ausplattiert. Die Agarplatten wurden für 3-7 Tage bis zur gewünschten Koloniegröße bei 29 °C inkubiert. Dauerkulturen von einzelnen Kolonien wurden, wie für *E. coli* beschrieben (3.1.1), angelegt und bei –80 °C gelagert.

3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und ihre Konzentrationsbestimmung

Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmide wurden in transformierten DH5α *E. coli* (3.1.1) vermehrt und anschließend mit Hilfe kommerziell verfügbarer Kits, die auf alkalischer Lyse basieren, isoliert. Für eine Minipräparation wurden 1,5-3,0 ml einer LB-Amp-Übernachtskultur mit Hilfe des *Wizard® Plus*

SV Minipreps DNA Purification System nach Herstelleranleitung aufgearbeitet. Dabei wurde abweichend von den Herstellerangaben keine alkalische Protease-Lösung nach der Zelllyse hinzugefügt sowie die Plasmid-DNA mit 50 µl autoklaviertem *Aqua bidest.* eluiert.

Für Maxipräparationen wurden 5 ml LB-Amp mit einer *E. coli* Kolonie inokuliert und für 6 h bei 37 °C rotierend (6 rpm) inkubiert. Abends wurden 250 ml LB-Amp in einem 1-l-Erlenmeyerkolben mit dieser Vorkultur angeimpft und auf einem Orbitalschüttler bei 200 rpm und 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur nach Herstellerangaben mit Hilfe des *NucleoBond® PC 500 Plasmid DNA Purification Kit* aufgearbeitet. Nach der Alkoholfällung wurde das DNA-Pellet bis zu drei Tage an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl autoklaviertem *Aqua bidest.* wieder gelöst.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Da Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen, wurde dies für eine photometrische Konzentrationsbestimmung herangezogen. Im Verhältnis zur Absorption bei 280 nm konnte außerdem eine Aussage über eine Verunreinigung mit Proteinen getroffen werden (Heptinstall & Rapley, 2000), da diese aufgrund ihrer aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin in diesem Wellenlängenbereich absorbieren (Coulter *et al.*, 1936). Für eine geringe Proteinkontamination wurde ein Verhältnis von $A_{260 \text{ nm}}$ zu $A_{280 \text{ nm}}$ von 1,8-2,0 angestrebt (Arnemann, 2019). Für die Messung wurden das *BioPhotometer* sowie eine Quarzküvette verwendet. Die DNA-Konzentration wurde mit folgender Gleichung berechnet (Arnemann, 2019):

$$c(\mu\text{g ml}^{-1}) = A_{260} \cdot 50 \mu\text{g ml}^{-1} \cdot \text{VF (Gl. 3.1)}$$

c: Konzentration an doppelsträngiger DNA
 A_{260} : Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$
 VF: Verdünnungsfaktor

3.1.4 Restriktionsverdau von DNA und Agarosegelelektrophorese

Restriktionsverdau von DNA

Im Rahmen von Klonierungen sowie, um Restriktionsschnittstellen zu überprüfen, wurden Plasmide von Restriktionsendonukleasen verdaut. Diese Enzyme spalten einen DNA-Strang bei Erkennung einer spezifischen Sequenz, wobei Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxyl-Ende entstehen (Pingoud & Jeltsch, 2001). Bei einem gleichzeitigen Verdau mit einem weiteren Enzym wurde auf die Kompatibilität des Puffers mit beiden Enzymen geachtet, sodass die Aktivität laut Hersteller jeweils mindestens 50 % betrug. Für Klonierungen wurden 1 µg Plasmid und 5 Units je Restriktionsendonuklease eingesetzt. Ein Restriktionsansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert.

Für die Kontrolle von Schnittstellen wurden ca. 0,2 µg Plasmid eingesetzt und mit 3 Units je Restriktionsenzym für mindestens 30 min inkubiert.

Agarosegelelektrophorese

Durch einen Restriktionsverdau linearisierte DNA wurde zur Identifizierung und Isolierung der Fragmente in Agarosegelen elektrophoretisch getrennt. Standardmäßig wurden einprozentige Agarosegele verwendet, wobei die Agarosekonzentration gegebenenfalls je nach den erwarteten Fragmentgrößen und der gewünschten Auflösung angepasst wurde. Für ein einprozentiges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Ergänzung des verdunsteten Wassers und Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid zur späteren Nukleinsäure-Detektion wurde die Lösung in eine vorbereitete Form für eine Flachbett-Elektrophorese gegossen. Nach Aushärten wurde der Gelträger in eine mit TAE gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die Proben wurden mit 1-2 µl des Orange G enthaltenden Probenpuffers (10x) versetzt. Bis zu 20 µl wurden in die Taschen des Gels aufgetragen. Als Größenmarker diente mit *Pst* I verdaute λ-DNA (Abb. 3.1). Die Proben wurden bei 120 V für 30-45 min elektrophoretisch nach der Größe der Fragmente getrennt. Der Gelträger wurde anschließend auf eine UV-Tischplatte überführt, wo bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm die Detektion des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids erfolgte.

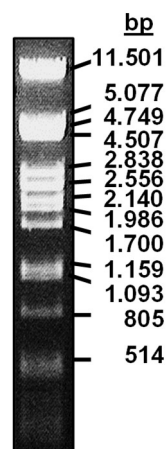


Abb. 3.1 *Pst* I verdaute λ-DNA in einem 1%igen Agarosegel

3.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen & Reinigung von PCR-Produkten

Nach der elektrophoretischen Trennung (3.1.4) wurden gewünschte DNA-Fragmente mit einem Skalpell unter UV-Licht ($\lambda = 366$ nm) aus dem Gel herausgeschnitten. Anschließend wurde mit Hilfe des *Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit* unter Verwendung des *Gel-Extraction*-Protokolls des Herstellers DNA aus den Agarosegelstücken isoliert. Die Elution der DNA erfolgte mit 20 µl autoklaviertem *Aqua bidest.*. Mit demselben Kit wurden ebenfalls PCR-Produkte nach dem *PCR-Clean-Up*-Protokoll des Herstellers gereinigt.

3.1.6 Ligation von DNA

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide im Rahmen von Klonierungen wurden doppelsträngige DNA-Fragmente mit kompatiblen, überhängenden Enden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zusammengefügt. Die DNA-Fragmente, die zuvor aus Agarosegelen isoliert wurden (3.1.5), wurden dabei in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt. Standardmäßig wurden 5-7 µl Gen-Fragment und 1-3 µl Vektor-Fragment mit 5 Units T4-DNA-Ligase und dem dazugehörigen Puffer zu einem Gesamtvolumen von 10 µl vermischt. Die Ligation erfolgte durch Inkubation für mindestens 30 min bei Raumtemperatur.

3.1.7 Ortsspezifische Mutagenese

Um einzelne DNA-Basen in einem Gen-Abschnitt auszutauschen, wurde ein Plasmid mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Die verwendeten Oligonukleotide (*primer*) waren üblicherweise nur teilkomplementär zu dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt, um die Mutation einzuführen. Abb. 3.2 zeigt das Oligonukleotid-Design für eine ortsspezifische Mutagenese. Unter Berücksichtigung zueinander passender Schmelztemperaturen (GC-Gehalt, Basenpaarlänge) sowie möglicher Dimer- und Sekundärstruktur-Bildungen wurde gegebenenfalls von diesem Design abgewichen.

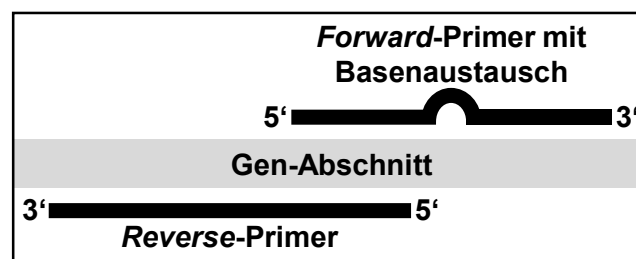


Abb. 3.2 Design der Oligonukleotide für eine ortsspezifische Mutagenese

Die Amplifikation des *template*-Plasmids erfolgte mit Hilfe der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase (Tab. 3.1) mit dem in Tab. 3.2 aufgeführten PCR-Temperaturprogramm. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 1 µl *Dpn* I versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsendonuklease *Dpn* I schneidet nur, wenn ihre Erkennungssequenz methyliert ist. Auf diese Weise wurde nur die *template*-DNA, jedoch nicht das PCR-Produkt geschnitten. Üblicherweise folgte anschließend eine Reinigung des Ansatzes unter Verwendung des *PCR-Clean-Up*-Protokolls (3.1.5), wobei die DNA mit 50 µl autoklaviertem *Aqua bidest.* eluiert wurde. Anschließend erfolgte eine Transformation von DH5α *E. coli* (3.1.1). Aus einzelnen Kolonien wurden die Plasmide isoliert (3.1.5) und mittels Sequenzierung (3.1.8) überprüft.

Tab. 3.1 Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für eine ortsspezifische Mutagenese.

Reagens	Volumen
Plasmid	ca. 100 ng
dNTP (2,5 mM)	4,0 µl
Forward-Primer (25 µM)	1,5 µl
Reverse-Primer (25 µM)	1,5 µl
PfuTurbo-DNA-Polymerase-Puffer (10x)	5,0 µl
PfuTurbo-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,8 µl
Autoklaviertes <i>Aqua bidest.</i>	ad 50 µl

Tab. 3.2 PCR-Temperaturprogramm für eine ortsspezifische Mutagenese.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s
16 Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	30 s
Primer-Hybridisierung	Annealing-Temperatur*	1 min
Elongation	72 °C	16** min
Finale Elongation	72 °C	20 min
Lagerung	8 °C	∞

Bemerkung:

* Bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen der beiden Primer wurde zunächst die niedrigere Temperatur gewählt.

** Elongationszeit für das Plasmid pDRTXa_optPfCRT. Dieser Schritt sollte mindestens 8 min beziehungsweise 2 min pro kb Plasmid dauern.

3.1.8 Sanger-Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung von Plasmiden wurde der Sanger-Sequenzierungsservice des Instituts für Klinische Molekularbiologie der CAU in Kiel beauftragt. Dort wurden mit Hilfe eines Sequenziergerätes mit 96 Kapillaren (*Applied Biosystems™ 3730xl DNA Analyzer*, Thermo Fisher Scientific) Sequenzierungen im Hochdurchsatz-Format durchgeführt. Die Sequenzierung beruhte auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977). Der Einbau von 2',3'-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphaten (ddNTPs) führt zum Abbruch der Amplifikation eines DNA-Abschnitts im Rahmen einer PCR. Durch eine Fluoreszenzmarkierung der ddNTPs kann bei einer nachfolgenden Kapillarelektrophorese auf die Position der DNA-Base geschlossen werden.

3.2 Allgemeine proteinchemische Methoden**3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford**

Die Konzentration von Proteinproben wurde nach Inkubation mit *RotiQuant®*-Reagenz photometrisch am *BioPhotometer* bestimmt. *RotiQuant®* enthält den als Bradford-Reagenz bekannten Farbstoff *Coomassie®-Brillant-Blau-G250*, dessen Absorptionsmaximum sich bei

Bindung an Proteine von rot zu blau verschiebt (Bradford, 1976). Die Konzentrationsberechnung beruhte auf einer Kalibrierung mit verschiedenen Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA). 800 µl der mit *Aqua bidest.* verdünnten Proteinprobe wurden mit 200 µl *RotiQuant®* vermischt. Nach Inkubation für 5-60 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm in Plastikkuvetten gemessen. Die Hintergrundabsorption durch den Puffer, der zur Proteinaufbewahrung verwendet wurde, wurde von der Absorption der Probe abgezogen.

3.2.2 SDS-PAGE, Western Blot und Coomassie®-Färbung von SDS-Gelen

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das denaturierend wirkende Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecylsulfate*) bildet mit Proteinen negativ geladenen Komplexe, die auf Grund ihrer Größe und Ladung elektrophoretisch getrennt werden können (Smith, 1985). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in diskontinuierlichen SDS-haltigen Polyacrylamid-Gelen. Eine Keramik- und eine Glasplatte (100 x 100 mm, Breite x Höhe) wurden durch zwei, seitlich angebrachte Abstandhalter (0,8 mm, Dicke) voneinander getrennt und in einem Gelgießstand für eine vertikale Elektrophorese fixiert. In die entstandene Spalte wurde die Lösung für das Trenngel gegossen. Die Lösung für das Sammelgel wurde über dem ausgehärteten Trenngel geschichtet und mit einem gezinkten Kamm abgeschlossen. Drei Teile Proteinprobe wurden mit einem Teil SDS-Ladepuffer (4x) durch Pipettieren gemischt, welcher Dithiothreitol (DTT) als reduzierendes Agens sowie den Farbstoff Bromphenolblau enthält. Die Mischung wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Je nach Größe der Kammzinken wurden die nach dem Aushärten des Gels entstandenen Probentaschen mit maximal 20-30 µl Probenvolumen gefüllt.

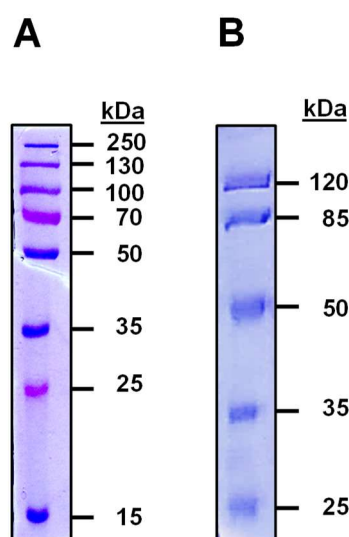


Abb. 3.3 Proteinmarker zum Größenvergleich in der SDS-PAGE: (A) *peqGOLD Protein Marker III* und (B) *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Trenngel: 12,5 % Acrylamid, unterschiedliche Laufzeiten).

Als Größenmarker wurden 3-5 µl eines kommerziell verfügbaren Proteinmarkers (Abb. 3.3) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in der mit Kathodenpuffer befüllten Elektrophoresekammer bei 160-200 V, bis der Farbstoff aus dem unteren Ende des Gels austrat. Im Anschluss wurde das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt. Die im Trenngel enthaltenen Proteine wurden durch einen Western Blot, eine *Coomassie*®-Färbung oder im Fall von fluoreszierenden Proteinproben durch Bestrahlung mit UV-Licht detektiert.

Western Blot

Im SDS-PAGE-Trenngel vorhandene Proteine wurden mit einer Elektrophorese unter halbtrockenen Bedingungen auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen, um sie einer Immunodetektion zugänglich zu machen. Eine PVDF-Membran wurde für ca. 60 s in Methanol und anschließend zusammen mit sechs *Whatman*®-Filterpapieren für mindestens 5 min im Transferpuffer eingeweicht. Das Trenngel wurde kathodenseitig auf die PVDF-Membran gelegt. Beidseitig von je drei *Whatman*®-Filterpapieren eingerahmt erfolgte der Proteintransfer durch Anlegen einer Spannung von 17 V für 60 min. Anschließend wurde die Membran zum Blockieren unspezifischer Bindestellen für mindestens 1 h in 20 ml MTBST inkubiert. Diese Inkubation sowie alle folgenden erfolgten dabei unter Bewegung auf einem Wippschüttler oder auf einem Flachbettschüttler. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper in 10 ml MTBST über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst kurz mit TBST gespült und dann dreimal für je 10-15 min mit 15-20 ml TBST gewaschen. Nach Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper in 10 ml MTBST für mindestens 1 h wurden diese Waschschrte wiederholt. Die Membran wurde mit dem *ClarityTM Western ECL Substrate Kit* entwickelt. Detektion und Dokumentation erfolgte mit einem Chemilumineszenz-Imager (2.4).

Coomassie®-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Durch Inkubation des SDS-PAGE-Trenngels für 1-2 h auf einem Wippschüttler mit der nach Herstellerangaben mit *Aqua bidest.* verdünnten *Rotiphorese*®-Blau-R-Lösung wurden Proteine analog zur Bradford-Konzentrationsbestimmung mit Brillant-Blau angefärbt. Durch anschließende Inkubation zunächst mit essigsauerm Ethanol 30 % (V/V) und später mit Wasser wurde der Hintergrund wieder entfärbt. Dabei wurde die zur Entfärbung verwendete Lösung mehrfach erneuert.

3.3 Produktion und Reinigung zellfreier Proteine

Das im Folgende vorgestellte Protokoll basiert auf dem vom Schwarz *et al.* (2007) und beschreibt die Gewinnung eines sogenannten S30-Extraktes aus einer 5-I-Kultur von *E. coli*.

3.3.1 Gewinnung eines S30-Extrakts aus *E. coli*

Eine Dauerkultur von BL21(DE3) wurde über Nacht auf einer LB-Agarplatte kultiviert. Am nächsten Tag wurden 5 ml LB mit einer Kolonie inokuliert und für etwa 6 h bei 37 °C rotierend (6 rpm) inkubiert. 50 ml LB wurden im Anschluss mit dieser Kultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf einem Orbitalschüttler bei 200 rpm kultiviert. Am Tag vor der Fermentation wurde außerdem ein 5-l-Bioreaktor, befüllt mit 4,5 l YPTG-Aminosäuren und 0,5 ml Polypropylen-glykol 2000 (50 % in *Aqua bidest.*), autoklaviert. Am nächsten Tag wurden durch Zugabe von 250 ml YPTG-Phosphatpuffer und 200 ml YPTG-Glukose-Lösung die einzelnen Bestandteile des YPTG-Mediums im Bioreaktorgefäß vereinigt. Das nun vollständige YPTG-Medium wurde mit der Übernachtskultur inokuliert. Die Temperatur, die Luftzufuhr, die Sauerstoffsättigung und der pH-Wert wurden zusammen mit der optischen Dichte während des Fermentationsprozesses überwacht. In Tab. 3.3 sind die über die Kontrolleinheit eingestellten Parameter für die Fermentation aufgeführt.

Tab. 3.3 Parameter für die Fermentation von *E. coli* in einem 5-l-Bioreaktor.

Parameter	Kennwert
Software	BioPAT® MCFS/DA 3.0
Kontrolleinheit	BIOSTAT® A plus
Fermentation	
Temperatur	37 °C
Rotorgeschwindigkeit	900 rpm
Druck der Luftzufuhr	1,5 bar
Belüftungsrate	10 vvm
Stoppen des Zellwachstums	
Temperatur	12 °C
Rotorgeschwindigkeit	5 rpm
Druck der Luftzufuhr	1,5 bar
Belüftungsrate	5 vvm

In der exponentiellen Wachstumsphase wurde das Zellwachstum bei Erreichen einer Ziel-OD₆₀₀ von 2,5-3,0 durch Abkühlen des Fermenters in einem Eis-Wasserbad für 45 min gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen in vier Zentrifugenbechern durch mehrfache Zentrifugation mit einem Ausschwingrotor für 15 min bei 4.500 g und 4 °C gesammelt. Die Zellpellets wurden dreimal mit 37,5 ml Puffer A gewaschen, wobei zum Entfernen des Überstandes die Zellen zweimal für 10 min, beim letzten Schritt für 30 min bei 8.000 g und 4 °C zentrifugiert wurden. Die feuchten Zellpellets wurden gewogen und anschließend bis zum Zellaufschluss bei –80 °C gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die vier Zellpellets auf Eis aufgetaut und in Puffer B unter Vermeidung von Schaumbildung suspendiert. Das Verhältnis von Puffer B zur Pelletmasse betrug 1,1:1,0.

Je zwei der vier Zellsuspensionen wurden vereinigt und die Zellen durch dreimaliges Passieren eines Hochdruck-Homogenisators (ca. 20.000 psi) aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde für 30 min bei 30.000 g und 4 °C zentrifugiert. Dadurch sollte eine auch für die folgenden Zentrifugationsschritte charakteristische Schichtung im Ultrazentrifugenröhrchen hervorgerufen werden, bestehend aus einem Pellet umgeben von einer trüben Phase, einem darüber liegenden, klaren Überstand und zuletzt einer darauf aufschwimmenden, öligen Schicht. Nur zwei Drittel des klaren Überstandes wurden jeweils in ein neues Gefäß überführt, während der Rest verworfen wurde. Der zuvor genannte Zentrifugationsschritt wurde mit dem Überstand wiederholt. Der sich dadurch ergebende Überstand wurde mit NaCl (4 M) versetzt, sodass eine Endkonzentration von 400 mM NaCl eingestellt wurde, und in einem auf 42 °C temperierten Wasserbad für 45 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einen Dialyseschlauch mit einem *molecular weight cut-off* (MWCO) von 14 kDa überführt und bei 4 °C über Nacht gegen 2,5 l Puffer C dialysiert, wobei der Dialysepuffer nach 2 h erneuert wurde. Der dialysierte Extrakt wurde am nächsten Tag erneut für 30 min bei 30.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der wie zuvor beschrieben gewonnene Überstand wurde zu 355 µl und 255 µl aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

3.3.2 Zellfreie Proteinproduktion

Die verwendeten *templates* enthielten *upstream* vom kodogenen DNA-Abschnitt den T7-Promoter. Mit der T7-RNA-Polymerase erfolgte die Transkription in mRNA, welche an aus *E. coli* isolierten Ribosomen (3.3.1) in Anwesenheit von tRNA aus *E. coli* und zwanzig proteinogenen Aminosäuren translatiert wurde. Für eine Regeneration der unter anderem als Energiequelle dienenden Nukleotide wurde die Kombination aus zwei Phosphatdonatoren und ihren Kinasen eingesetzt, nämlich Phosphoenolpyruvat/Pyruvatkinase und Acetylphosphat/Acetatkinase. Dabei ist die Acetatkinase bereits im S30-Extrakt enthalten (Ryabova *et al.*, 1995). Zum Schutz und zur Stabilitätsförderung einiger Komponenten dienten RNase- und Protease-Inhibitoren sowie DTT (Schwarz *et al.*, 2007). Die zellfreie Proteinproduktion wurde in der CECF-Variante (*continuous exchange cell free system*) durchgeführt, welche an ein Protokoll von Schwarz *et al.* (2007) angelehnt ist. Die für die zellfreie Produktion benötigten Bestandteile teilen sich in zwei Kompartimente, die durch eine semi-permeable Membran getrennt sind. Diese erlaubt den Austausch von niedermolekularen Stoffen entlang ihres Konzentrationsgradienten. Der sogenannte *reaction mixture* (RM) ist der Ort der Transkription und Translation. Der *feeding mixture* (FM) diene als Nährkompartiment zur Bereitstellung frischer Edukte für die Reaktion und ermöglichte zusätzlich aufgrund seines deutlich größeren Volumens (RM:FM = 1:15-17) auch eine Verdünnung störender Nebenprodukte wie Pyrophosphat (Schwarz *et al.*, 2007).

Der RM und der FM wurden durch Zusatz kompartimentspezifischer Bestandteile aus einem gemeinsamen Mastermix (MM) erstellt (Tab. 3.4). Das zellfreie System erlaubte durch Zusatz eines Detergens die kotranslationale Solubilisierung von MPs. Für die zellfreie Produktion von PfCRT wurden dazu 0,8 % Brij® 78 verwendet (Petersen, 2017). Durch Multiplikation der in Tab. 3.4 genannten Zusammensetzung von 1 ml RM und 17 ml FM mit einem Faktor wurde die Ansatzgröße variiert.

Tab. 3.4 Zellfreie Proteinproduktion mit 0,8 % Brij® 78 und 10 mM Mg²⁺.

Komponente	Konzentration der Stammlösung	MM (µl)	FM (µl)	RM (µl)
NaN ₃	10 %	90,0		
Polyethylenglykol 8000	40 %	900,0		
Kaliumacetat	4,0 M	678,6		
Magnesiumacetat	1,0 M	91,8 (127,8*)		
HEPES/EDTA-Puffer	24x	660,0		
<i>cOmplete</i> TM	50x	360,0		
Folinsäure	10 mg ml ⁻¹	180,0		
DTT	500 mM	72,0		
NTP-Mix	75 x	240,0		
Phosphoenolpyruvat	1,0 M	360,0		
Acetylphosphat	1,0 M	360,0		
Aminosäure-Mix	4,0 mM	2250	2338	
RCWMDE	16,7 mM	1080		
Brij®78	15,0 %	960,0		
Mastermix (MM)			7822 (7856*)	460,1 (462,1*)
S30-Puffer	1x		5950	
Pyruvatkinase	10 mg ml ⁻¹			8,0
<i>E. coli</i> tRNA	40 mg ml ⁻¹			17,5
T7-RNA-Polymerase	350 U µl ⁻¹			42,9
<i>RiboLock</i> RNase-Inhibitor	40 U µl ⁻¹			7,5
Plasmid-DNA				22,5 µg
S30-Extrakt	1x			350,0
<i>Aqua bidest.</i>			ad 17000	ad 1000
Total (µl)		Σ 8282	Σ 17000	Σ 1000

Bemerkung: MM = Mastermix; FM = *feeding mixture*; RM = *reaction mixture*; * für 12 mM Mg²⁺

Zellfreie Produktion im Präparativen Maßstab

Eine Dialysekassette (10k MWCO) wurde mit Hilfe von 1-ml-Spritzen und Kanülen mit 1 ml des RM befüllt und in die mit 17 ml FM befüllte Kammer getaucht (Abb. 3.4). Die Kammer wurde von der Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts der CAU in Kiel in Anlehnung an Schneider *et al.* (2010) gebaut und war mit einem Deckel versehen, welcher durch zwei Schrauben fixiert wurde. Der Ansatz wurde in einem sanft bewegten, auf 30 °C beheizten

Wasserbad für 20-25 h inkubiert. Die Kammer wurde dabei auf einem Gestell befestigt, sodass sie sich knapp über der Wasseroberfläche während der Inkubation befand. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der RM aus der Dialysekassette entnommen. Zum Spülen der Dialysekassette wurde 1 ml TRIS-Puffer verwendet, welcher anschließend mit dem RM vereinigt wurde. Bei einer Ansatzvergrößerung wurden mehrere Kammern parallel inkubiert und später vereinigt.

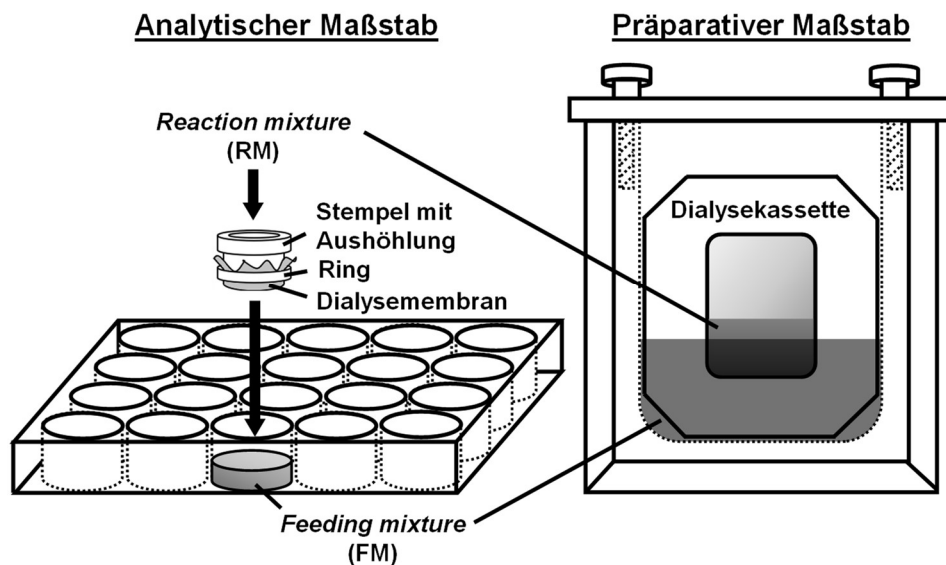


Abb. 3.4 Apparativer Aufbau für die zellfreie Synthese im analytischen (links) und im präparativen Maßstab (rechts). Für den analytischen Maßstab wurde eine Dialysemembran mit Hilfe eines Rings über einen innen ausgehöhlten Stempel gespannt. Die Unterseite der Dialysemembran wurde in den *feeding mixture* (FM) eingetaucht, während der *reaction mixture* (RM) auf die Oberseite im Inneren des Stempels platziert wurde. Im präparativen Maßstab wurde der RM in eine Dialysekassette gefüllt, die in einer verschließbaren Kammer in den FM eintauchte.

Zellfreie Produktion im analytischen Maßstab

Bei der zellfreien Produktion im analytischen Maßstab wurden pro Ansatz mit 55 µl RM und 850 µl FM verwendet. Die Inkubation fand in Reaktionsgefäßen statt, die von der Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts der CAU in Kiel gebaut wurden. Sie bestanden aus einem Teflonring, mit dessen Hilfe eine zuvor mit *Aqua bidest.* benetzte Dialysemembran (14k MWCO) über einen Stempel gespannt werden konnten. Dieser wurde dann in eine handelsübliche 24-*well*-Zellkultur-Platte, die bereits mit FM befüllt war, eingetaucht. Der Stempel war innen ausgehöhlt, sodass der RM in diese Aussparung auf die Dialysemembran platziert wurde (Abb. 3.4) Die Platte wurde mit *Parafilm® M* bedeckt und mit dem Deckel verschlossen. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten wie zuvor für den präparativen Maßstab beschrieben.

Im analytischen Maßstab wurde im Rahmen der Qualitätskontrolle einer neuen S30-Extrakt-Charge gearbeitet. Die Eignung eines neu hergestellten S30-Extraktes wurde durch zellfreie Produktion der mGFP5-Variante des ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* stammenden grün fluoreszierenden Proteins (GFP) überprüft (Heim *et al.*, 1995). Zum Vergleich wurde parallel auch eine Produktion mit einer vorherigen S30-Extrakt-Charge durchgeführt. Zugleich wurde die Mg^{2+} -Konzentration für den neuen Extrakt ermittelt, die zu einer maximalen Fluoreszenz, also einer größtmöglichen Ausbeute führte. Die optimale Magnesiumkonzentration wurde durch Variation dieser bei sonst identischen Produktionsbedingungen ermittelt. Als wasserlösliches Protein wurde das aufgeführte Pipettierschema für die Produktion für GFP weiterhin durch den Verzicht eines Detergens angepasst.

Da der analytische Maßstab für die Testung verschiedene Produktionsbedingungen geeignet ist, wurde dieser auch für Eignung verschiedener Detergenzien als Zusatz zur CECF-Produktion von MPs verwendet. Der RM und der FM wurden nach benötigter Anzahl an Reaktionen nach dem bekannten Pipettierschema, jedoch ohne Zusatz eines Detergens vorbereitet. Ein Testansatz wurde durch Zugabe des gewünschten Detergens in *Aqua bidest.* zu 90 % des RM bzw. FM finalisiert.

3.3.3 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die in dieser Arbeit zellfrei synthetisierten Proteine trugen terminal einen His₁₀-tag, über dessen Koordination von Nickel-Ionen die zu reinigenden Proteine an Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarosekügelchen (Ni^{2+} -NTA) immobilisiert wurden. Zur Elution des Zielproteins wurde diese Koordination durch Zusatz von Imidazol zum Reinigungspuffer wieder gelöst (Bornhorst & Falke, 2000). Eine 50%ige Suspension von Ni^{2+} -NTA, welche einem Drittel des Volumens an RM entsprach, wurde auf eine Fritte überführt, mehrfach mit dem zur Reinigung verwendeten TRIS-Puffer gewaschen und mit TRIS-Puffer zum RM gegeben. Das Gesamtvolumen entsprach üblicherweise dem achtfachen Volumen an RM. Die Mischung wurde über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert und am nächsten Tag wieder auf eine Fritte überführt. Dadurch baute sich ein Matrixbett oberhalb der Fritte auf. Der Durchfluss wurde wie alle folgenden Reinigungsfraktionen aufbewahrt. Die Matrix wurde zum Waschen üblicherweise mit dem zwanzigfachen Säulenvolumen und für die nachfolgenden Elutionsschritte mit dem fünffachen Säulenvolumen mit TRIS-Puffer durchspült. Dabei wurde der Imidazolgradient im TRIS-Puffer von 20 mM Imidazol zum Waschen bis auf 500 mM Imidazol schrittweise erhöht. Zum Schluss wurde die Matrix in dem gleichen Volumen TRIS-Puffer suspendiert, wie zur Elution verwendet wurde.

3.3.4 Konzentrierung von Proteinproben

Das Probenvolumen von Proteinproben wurde durch Zentrifugation nach Herstellervorgaben in einem *Amicon*®-Zentrifugierfilter auf das gewünschte Endvolumen eingengt. Es wurden Filter mit einem *cut-off* von 30 kDa und von 100 kDa verwendet. Bei der Auswahl der Filter-Ausschlussgröße sollte das Molekulargewicht des Zielproteins sowie auch die Mizellgröße bei Verwendung von Detergenzien berücksichtigt werden, um einen Probenverlust sowie eine Aufkonzentrierung des Detergens im Probenüberstand zu verringern (Strop & Brunger, 2005). Proteinproben mit Imidazol wurden mit TRIS-Puffer verdünnt, sodass eine Endkonzentration an Imidazol von unter 100 mM erreicht wurde, um die Integrität des Filters zu gewährleisten.

3.3.5 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Mit dem Chromatographiesystem *ÄKTApurifier* wurden Proteinproben mit den in Tab. 3.5 aufgeführten Parametern, die mit der Software *Unicorn 5.2* kontrolliert wurden, einer Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) unterzogen. Die Säule wurde zuvor mit mindestens zwei Säulenvolumina *Aqua bidest.* gespült und mit dem jeweiligen Reinigungspuffer equilibriert. Proben wurden für 10 min bei 10.000 *g* und 4 °C zentrifugiert, bevor der Überstand mit Hilfe einer 1-ml-Einmalspritze mit Luer-Ansatz über den Luer-Lock-Adapter ins System aufgetragen wurde. Chromatographie-Säule und Fraktions-sammler wurden bei 4 °C gekühlt.

Tab. 3.5 Parameter für die Größenausschlusschromatographie (*ÄKTApurifier*).

Parameter	Kennwert
Hochdruckalarm	1,5 MPa
Injektionsloop	500 µl
Probenauftrag	max. 500 µl
Fließmittel	Reinigungspuffer
Säulenvolumen	24 ml
Fließgeschwindigkeit	0,35 ml min ⁻¹
Fraktionsvolumen	500 µl

3.4 Untersuchung von rekombinanten Proteinen in *S. cerevisiae*

3.4.1 Gewinnung der Membranfraktion von *S. cerevisiae*

Die Zellen von 40-100 ml einer Übernachtskultur von *S. cerevisiae* wurden bei einer Ziel-OD₆₀₀ von etwa 1,0 durch Zentrifugation für 5 min bei 4.000 *g* und 4 °C geerntet. Nach Waschen mit 50 ml kaltem *Aqua bidest.* und 10 ml kaltem Extraktionspuffer wurde das Zellpellet für mindestens 30 min bei –80 °C gelagert. Zum mechanischen Aufschluss wurden die auf Eis aufgetauten Zellen in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen mit je 0,5 ml Extraktionspuffer und säuregewaschenen Glaskügelchen versetzt und durch wiederholtes Mischen für jeweils 30 s

auf dem auf Stufe 10 betriebenen *Vortex*-Mischer aufgeschlossen. Der Mischvorgang wurde 10-15-mal wiederholt, wobei zwischen den Mischvorgängen die Zellen jeweils 1 min auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 1.000 g und 4 °C Zelltrümmer und die Glaskügelchen abgetrennt. Das Pellet wurde nach Zugabe von 0,5 ml Extraktionspuffer erneut wie zuvor beschrieben behandelt. Nach Zentrifugation bei 1.000 g wurde der Überstand mit dem vorherigen vereinigt und für 5 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem 1,5-ml-Ultrazentrifugengefäß für 40 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die durch Zentrifugation bei 10.000 g und 100.000 g erhaltenen Pellets wurden jeweils in 50-100 µl Lagerungspuffer suspendiert. Bei geringer Konzentration der Zielproteine in der 100.000-g-Pellet-Fraktion, wurde für diese die Isolation nach dem 10.000-g-Zentrifugationsschritt beendet.

3.4.2 Protoplastierung von *S. cerevisiae* & Streulichtmessungen

Protoplastierung von *S. cerevisiae*

Bei der Protoplastierung wurde die Zellwand von *S. cerevisiae* vom Stamm BY4742Δ*fps1* enzymatisch verdaut, um so osmotisch sensiblere Zellen zu erhalten. Es wurden üblicherweise filtrierte Medien verwendet (Ø 0,2 µm). Die Zellen von 50 ml einer Übernachtskultur von *S. cerevisiae* wurden bei einer OD₆₀₀ von etwa 1,0 durch Zentrifugation für 5 min bei 4.000 g und 4 °C geerntet, mit 3 ml eines MOPS-Puffers (50 mM MOPS, 0,2 % 2-Mercaptoethanol, pH 7,2) gewaschen und anschließend in 2 ml dieses Puffers auf einem Orbitalschüttler bei 140 rpm und 30 °C geschüttelt. Nach 15 min wurden 120 U Zymolyase (entsprechend etwa 600 U g⁻¹ Zellpellet), etwa 100 mg BSA sowie 4 ml Protoplastierungspuffer hinzugefügt. BSA dient hierbei als Alternativsubstrat, um die rekombinanten Zielproteine vor einer proteolytischen Restaktivität der Zymolyase-Präparation zu schützen. Die Protoplastierung wurde nach 1 h durch Zentrifugation bei 2.000 g und 4 °C beendet. Die erhaltenen Protoplasten wurden mit 5 ml Aufbewahrungspuffer gewaschen und danach erneut in diesem Puffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4 °C oder auf Eis gelagert. Vor Verwendung wurde diese auf eine OD₆₀₀ von etwa 2 mit dem Aufbewahrungspuffer verdünnt.

Streulichtmessungen mit einer *Stopped-Flow*-Apparatur

Messung der Glycerolpermeabilität

Protoplastenpräparationen wurden in einer *Stopped-Flow*-Apparatur (SFM-2000) mit dem Assaypuffer gemischt. Die Zusammensetzung des Assaypuffers entsprach der des Aufbewahrungspuffers mit der Änderung, dass für hyperosmotische Bedingungen 0,6 M Glycerol hinzugefügt und für isoosmotische Bedingungen 0,6 M Saccharose durch eine entsprechende Menge an Glycerol ersetzt wurden. Die Osmolarität von letzterem wurde gegen mit Leerplasmid transformierte Protoplasten überprüft und durch Glycerolzusatz zum Puffer

justiert. Durch das Mischen gleicher Volumina an Protoplasten und Assaypuffer wurden die Protoplasten so in beiden Fällen einem nach innen gerichteten Gradienten von $\geq 0,3$ M Glycerol ausgesetzt. Glycerol diente als Substrat für die Untersuchung der Funktion von Aquaglyceroporinen. Veränderungen des Zellvolumens wurden über eine Messung der Intensität der Lichtstreuung im 90° -Winkel zur Lichtquelle zeitlich nachverfolgt (Abb. 3.5). Die eingestellten Messparameter sind in Tab. 3.6 aufgeführt.

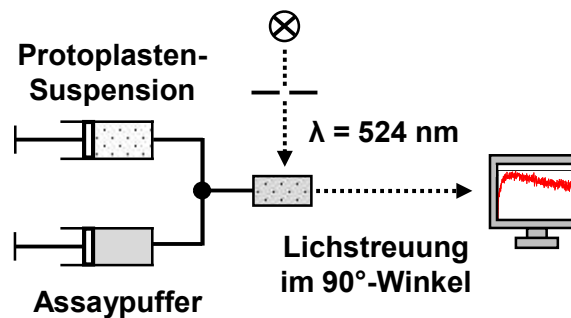


Abb. 3.5 Schematischer Aufbau der *Stopped-Flow*-Apparatur für die zeitabhängige Lichtstreuungsmessung.

Tab. 3.6 Messparameter der *Stopped-Flow*-Apparatur.

Parameter	Kennwert
Xe/Hg-Bogenlampe	100 W
Monochromator	524 nm
Output-Filter	300 μ s
Photomultiplier	700 x
Injektionsvolumen	150 μ l
Mischungsverhältnis	1:1
Gesamtflussrate	14 ml s ⁻¹
Voraussichtliche Totzeit	1,6 ms
Datenpunkte	4000-8000

Auswertung der Signalkurven

Für hypertone Bedingungen ergeben sich biphasische Signalkurven, für isotone Bedingungen monophasische Signalkurven. Die Signalkurven wurden mit der Software *Bio-Kine* ausgewertet. Dazu wurden etwa fünf bis neun Kurven, die unter derselben Messbedingung aufgenommen wurden, gemittelt. Unter hypertonen Bedingungen erhaltene, gemittelte Signalkurven wurden zwischen 0 V und 1 V normiert. Dazu wurde das Startsignal zu 0 V definiert und die Kurve mit einem Faktor multipliziert, sodass das Kurvenmaximum 1 V entsprach. Trotz des zuvor erwähnten Justierens des Messpuffers für isotone Bedingungen, war in den Signalkurven der Aquaglyceroporin exprimierenden Protoplasten in der ersten Sekunde ein Puffereffekt zu sehen. Das AQP-spezifische Signal wurde nach etwa 1 s beobachtet. Für die Normierung wurden das Signal der gemittelten Signalkurven aus isotonen

Messbedingungen einheitlich bei 1 s auf (0 s | 1 V) festgelegt. Die Normierung auf 1 V wurde wie zuvor beschrieben durch Multiplikation mit einem Faktor erreicht. Nach Normierung wurden die Kurven je nach Verlauf zweifach-exponentiell (Gl. 3.2 für biphasische Kurven) oder einfach-exponentiell (Gl. 3.3 für monophasische Kurven) gefittet.

$$I(t) = a \cdot t + b + c_1 \cdot e^{(-k_1 \cdot t)} + c_2 \cdot e^{(-k_2 \cdot t)} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

$$I(t) = a \cdot t + b + c_1 \cdot e^{(-k_1 \cdot t)} \quad (\text{Gl. 3.3})$$

I: Intensität der Lichtstreuung in V
t: Zeit in s
a: Steilheit
b: Offset (Achsenversatz)
c: Amplitude
k: Ratenkonstante

Die tiefgestellte Eins bzw. Zwei bei der Amplitude c und der Ratenkonstante k bezieht sich hierbei auf die von Wasser bzw. von Glycerol dominierte Phase. Bei sehr langsamen Permeabilitätsraten wurde auch linear gefittet. Der unter hyperosmotischen Bedingungen bestimmte Glycerolpermeabilitätskoeffizient wurde nach Wree *et al.* (2011) mit der folgenden Gleichung berechnet.

$$P_{\text{Gly}} = \left| \frac{dI}{dt} \right| \cdot \frac{V_0 \cdot c_{\text{out}}}{S_0 \cdot c_{\text{diff}}} \quad (\text{Gl. 3.4})$$

P_{Gly} : Glycerolpermeabilitätskoeffizient
 $|dI/dt|$: initiale Steigung
 V_0 : initiales mittleres Protoplastenvolumen (65,45 μm^3)
 S_0 : initiale mittlere Protoplastenoberfläche (78,54 μm^2)
 c_{out} : externe Konzentration (1,5 M)
 c_{diff} : Glycerolgradient (0,3 M)

Bestimmung von IC_{50} -Werten

Zur Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) wurden Aquaglyceroporin exprimierende Protoplasten mit den zu testenden Substanzen bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend einem isoosmotischen Glycerolgradienten ausgesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pentamidin-Biotin (3.5) (in DMSO) sowie die Ionophore Gramicidin (in Ethanol), Nigericin (in Ethanol) und CCCP (in DMSO) untersucht. Die Vorinkubationszeit betrug dabei für Ersteres 10 min, für die Ionophore 20 min jeweils bei Raumtemperatur. Die Konzentration des Lösungsvermittlers wurde in den Testansätzen sowie den Kontrollen bei $\leq 1\%$ gehalten und in Ausnahmefällen auf 2 % erhöht. Als Maß für die Glycerolpermeabilität diente die initiale Steigung, die durch Ableitung der Gleichung des Kurvenfits zum Zeitpunkt Null erhalten wurde.

Anschließend wurden die Werte auf einen Aktivitätsbereich von 0-100 % skaliert (Gl. 3.5). Wenn die Inhibition angegeben ist, so wurde diese durch Subtraktion der jeweiligen Aktivität (%) von 100 % erhalten.

$$\text{Aktivität (\%)} = 100 \cdot \frac{m - m_{(-)}}{m_0 - m_{(-)}} \quad (\text{Gl. 3.5})$$

m: initiale Steigung der Protoplasten mit Testsubstanz
 m₍₋₎: initiale Steigung der Protoplasten, die kein AQP exprimieren
 m₀: initiale Steigung der AQP exprimierenden Protoplasten ohne Testsubstanz

3.4.3 Messung der Trübung von Hefekulturen mit dem *Bioscreen C*

Wachstum von *S. cerevisiae* in Anwesenheit von Chloroquin

Mit Hilfe einer densitometrischen Messung mit dem *Bioscreen C* wurde der Einfluss von CQ auf das Wachstum von *S. cerevisiae* vom Stamm W303-1A, die PfCRT, PfCRT-Varianten oder keine rekombinanten Proteine exprimierten, untersucht. Eine Übernachtskultur wurde in filtriertem SD-AHLW bis zu einer OD₆₀₀ < 1 wachsen gelassen und dann auf eine OD₆₀₀ von 0,02 verdünnt. Eine Stammlösung von Chloroquin-Diphosphat in filtriertem SD-AHLW wurde seriell in 100-*well*-Platten mit Medium zu 150 µl verdünnt. Anschließend wurden jeweils 150 µl der Hefesuspension ergänzt, sodass ein Gesamtvolumen von 300 µl und eine berechnete Start-OD₆₀₀ von 0,01 erzielt wurde. Im *Bioscreen C* wurden bis zu zwei Platten gleichzeitig bei 29 °C inkubiert. Die durch Zellteilung einsetzende Trübung wurde mit Hilfe eines Breitbandfilters in festen Zeitintervallen verfolgt. Die Geräteeinstellungen und Messparameter sind in Tab. 3.7 aufgeführt.

Tab. 3.7 Bioscreen C: Geräteeinstellungen und Messparameter.

Parameter	Kenngroße
Gesamtvolumen je <i>well</i>	300 µl
Start-OD ₆₀₀ der Hefekultur	0,01
Temperatur	29 °C
Breitbandfilter	420-580 nm
Messintervall	stündlich
Schütteln	vor Messung
Schütteldauer	10 s
Schüttelgeschwindigkeit	normal
Schüttelamplitude	gering
Schüttelstop	10 s vor Messung

Die erste Messung wurde direkt nach Start des Geräts durchgeführt. Nach etwa 1 h wurde die Soll-Temperatur von 29 °C erreicht. Als *blank* wurde der nach einer Stunde aufgezeichnete Wert von allen weiteren Messwerten abgezogen.

Als Maß für das Wachstum wurde die Fläche unter der Wachstumskurve (AUC, *area under the curve*) nach der Trapez-Methode berechnet (Gl. 3.6) (Abb. 3.6).

$$\text{AUC} = \sum \frac{(t_{i+1} - t_i) \cdot (A_{i+1} + A_i)}{2} \quad (\text{Gl. 3.6})$$

AUC: Fläche unter der Kurve

t_i : Zeitpunkt

A: Absorption

Zur Darstellung des relativen Wachstums wurde die AUC der in Anwesenheit von CQ gewachsenen Hefekulturen zur AUC der Hefekultur ins Verhältnis gesetzt, welche ohne CQ-Zusatz gewachsen ist. Als Zeitintervall zur AUC-Berechnung wurde der Beginn der Messung bis zum Eintritt der Kontrolle in die Plateauphase definiert. Aufgrund schwankender *lag*-Phasezeiten variiert dieser Zeitraum für jedes Hefekonstrukt und bei jedem Experiment. Jedes biologische Replikat wurde mindestens als technische Triplikate gemessen, deren arithmetisches Mittel in die Auswertung einging.

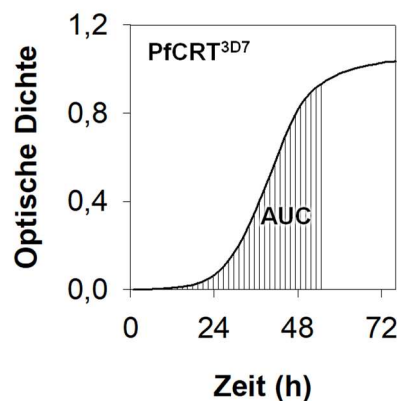


Abb. 3.6 Auswertung der Trübungsmessung von Hefekulturen über die Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC). Die OD nach 1 h wurde von allen Werten subtrahiert. Folglich zeigt die Kurve die Veränderung der optischen Dichte ($\lambda = 420\text{--}580\text{ nm}$) und somit das Wachstum einer Kultur am Beispiel einer PfCRT^{3D7} exprimierenden Hefe in SD-AHLW ($V = 300\text{ }\mu\text{l}$).

Einfluss des Wachstums von Verapamil auf das Wachstum von *S. cerevisiae*

Eine Übernachtskultur von transformierter *S. cerevisiae* vom Stamm W303-1A wurde in SD-AHLW bis zu einer $\text{OD}_{600} < 1$ wachsen gelassen und anschließend auf eine OD_{600} von 0,013 mit Medium verdünnt. In 100-*well*-Platten wurden je *well* 240 μl der verdünnten Hefesuspension zu unterschiedlichen Anteilen mit einer wässrigen Lösung von CQ, Verapamil (VP) oder *Aqua bidest.* zu einem Gesamtvolumen von 300 μl ergänzt. Das Wachstum der Hefesuspension wurde durch eine Trübungsmessung mit den in Tab. 3.7 genannten Parametern mit dem *Bioscreen C* verfolgt. Die Auswertung erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben über die AUC.

Testung der Malaria-Box-Substanzbibliothek auf einen PfCRT-Inhibitor

Eine Übernachtskultur von PfCRT exprimierenden *S. cerevisiae* vom Stamm W303-1A wurden in filtriertem SD-AHLW bis zu einer $OD_{600} < 1$ wachsen gelassen. Chloroquin-Diphosphat wurde in filtriertem SD-AHLW gelöst. Die Hefezellen wurden mit der CQ-Stammlösung und SD-AHLW zu einer OD_{600} von 0,0101 und einer Konzentration von 10 mM CQ verdünnt. Die Malaria-Box-Substanzen wurden als Stammlösung von 800 μ M in DMSO verwendet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Von jeder Substanzlösung wurden jeweils 3,75 μ l in 100-*well*-Plates vorgelegt und mit der 10 mM CQ enthaltenden Hefesuspension versetzt, sodass ein Endvolumen von 300 μ l, eine DMSO-Konzentration von 1,25 % und eine Endkonzentration von 10 μ M je Substanz erzielt wurden. Als Kontrollen wurden auf jeder Platte PfCRT exprimierende Hefen mit und ohne CQ-Zusatz im Medium mitgeführt. Statt einer Substanz wurde in diesen Kontrollansätzen 3,75 μ l DMSO (1,25 %) vorgelegt. Wie zuvor wurde die AUC als Parameter für das Hefewachstum berechnet, wobei das Wachstum der Hefen in Anwesenheit der Substanzen zum Wachstum der Kontrollen ins Verhältnis gesetzt und zwischen 0 % und 100 % skaliert wurde (Gl. 3.7).

$$\Delta \text{Wachstum (\%)} = 100 \cdot \frac{AUC - AUC_{10}}{AUC_0 - AUC_{10}} \quad \text{Gl. 3.7}$$

AUC: AUC in Anwesenheit der Testsubstanz

AUC₁₀: AUC in Anwesenheit von 10 mM CQ

AUC₀: AUC in Anwesenheit von 0 mM CQ

3.5 Synthese von Pentamidin-Biotin

Pentamidin-Biotin **9** ist ein asymmetrisches Derivat von Pentamidin. Einer der zwei Benzamidin-Reste wurde gegen ein Benzamid ersetzt, das durch einen kurzen Kohlenstofflinker mit einem Biotin-Molekül verknüpft ist. Um dieses zu erhalten, wurden zwei aromatische Verbindungen durch eine Williamson-Ethersynthese verknüpft. Die Ausgangsmoleküle wurden zuvor synthetisch generiert. Eine ausführliche Beschreibung aller Syntheseschritte sowie die Analytik des Endprodukts ist dem Anhang (7.2) beigelegt.

Zunächst wurde 4-Hydroxybenzamidinhydrochlorid (**1**) mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O) umgesetzt (I.). Damit wurde unter Ausbildung einer Carbamat-Struktur eine *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc-Gruppe) ins Ausgangsmolekül **1** eingeführt, welche als Schutzgruppe für das Amidin fungierte. Aus dem geschützten Amidin **2** und 1,4-Dibrombutan wurde im zweiten Schritt mittels Williamson-Ethersynthese der asymmetrische Ether **3** synthetisiert (II.). Das zweite Ausgangsprodukt wurde in drei Schritten generiert. Ein Biotinester, (+)-Biotin-*N*-succinimidylester (**4**), wurde mit *N*-Boc-1,4-propandiamin in Gegenwart von Triethylamin umgesetzt (III.). Dabei wurde im Sinne einer Esterspaltung durch den nukleophilen Angriff des Amins unter Freisetzung von Succinimid das Amid **5** hergestellt. Im

nächsten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe mit Hilfe von Trifluoressigsäure abgespalten (IV.). Das nun entschützte Amin **6** wurde in einer weiteren Esterspaltung von 4-Hydroxybenzimidessäureethylesterhydrochlorid unter Ausbildung des Amids **7** eingesetzt (V.). Die so erhaltenen Ausgangsstoffe **3** und **7** wurden nun im Sinne einer Williamson-Ethersynthese zu dem asymmetrischen Ether **8** verknüpft (VI). Im letzten Schritt wurde die letzte noch vorhandene Boc-Schutzgruppe durch Zuführen von HCl-Gas unter Freisetzung des Amidins abgespalten (VII). Dabei wurde Pentamidin-Biotin **9** als Hydrochlorid erhalten.

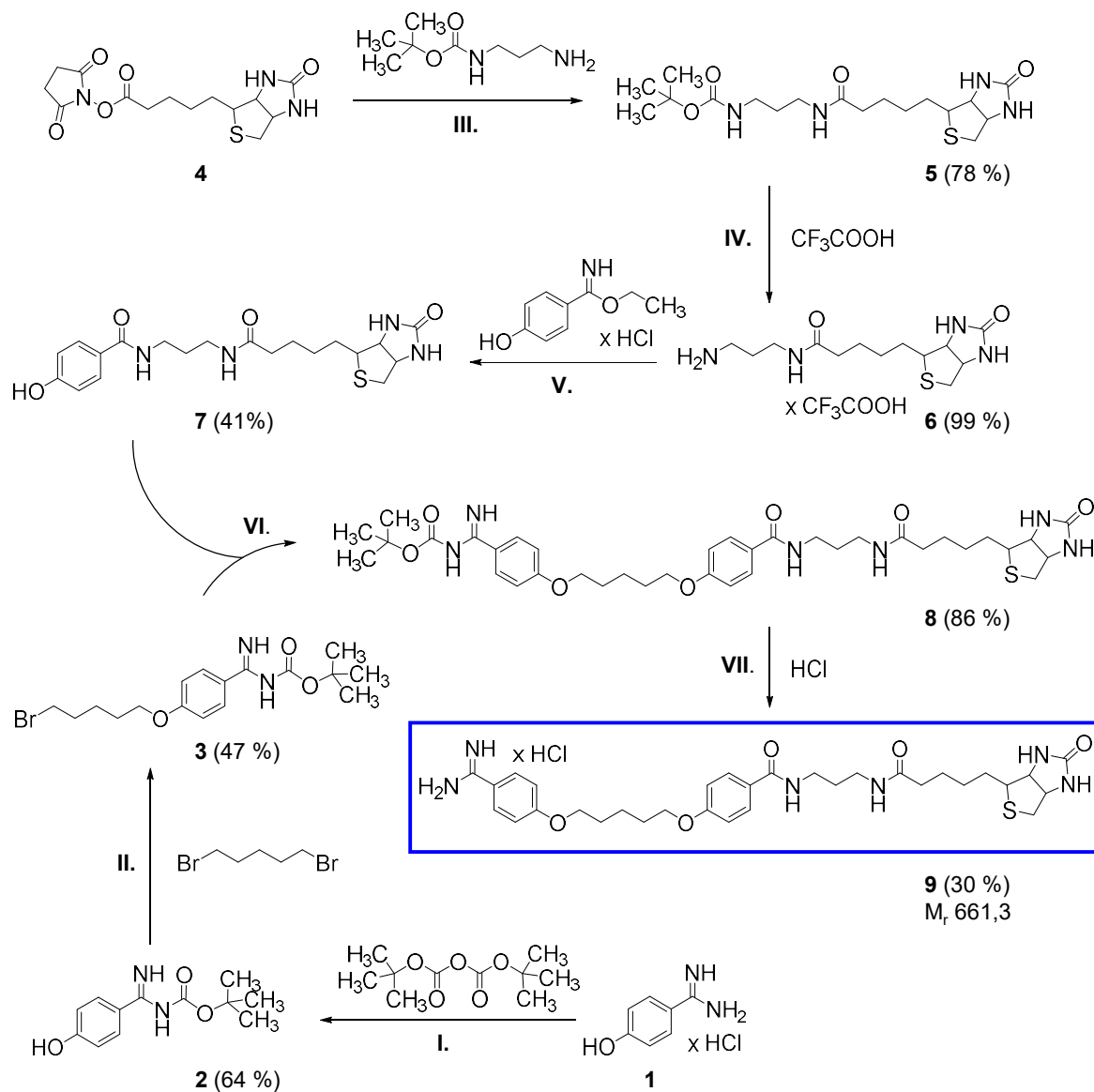


Abb. 3.7 Darstellung von Pentamidin-Biotin in sieben Schritten. Die praktische Ausbeute ist bezogen auf die theoretische in Prozent angegeben. Das Endprodukt **9** ist mit einem blauen Rahmen markiert. Die Synthese wurde von B. Henke (Pharmazeutisches Institut, CAU, Kiel) durchgeführt.

3.6 Viabilitätsbestimmung und Mikroskopie von Trypanosomen

Eine Viabilitätstestung und Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie von Trypanosomen erfolgte in Kooperation mit D. Horn und J. C. Faria an der *School of Life Sciences, University of Dundee* (Dundee, UK).

Bestimmung der Viabilität von Trypanosomen mit *AlamarBlue*®

Zur Beurteilung der Zytotoxizität von Pentamidin-Biotin **9** auf Trypanosomen wurde die halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) in einem Viabilitätsassay mit dem membran-permeablem Redoxindikator Resazurin (*AlamarBlue*®) bestimmt. Durch Reduktions-äquivalente, welche in metabolischen Prozessen lebender Zellen, in Trypanosomen vorwiegend aufgrund der glykolytischen Energiegewinnung (Räz *et al.*, 1997), bereitgestellt werden, wird das blaue Resazurin zu dem pinken, fluoreszierenden Resorufin reduziert (Rampersad, 2012).

Die in DMSO gelösten Testsubstanzen wurden in 96-well-Platten (*Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol*) seriell mit HMI-11-Medium (Hirumi & Hirumi, 1989) verdünnt und mit Trypanosomen zu einem Gesamtvolumen von 200 μ l je well versetzt. Die nachfolgende Inkubation erfolgte ohne Schütteln bei 37 °C. Eine wässrige Lösung von *AlamarBlue*® (10 mM Resazurin) wurde mit Medium zu 500 μ M verdünnt. Nach 68 h Inkubation wurden 20 μ l dieser Lösung zu jedem well hinzugefügt, sodass eine Endkonzentration von 50 μ M Resazurin vorlag. Nach weiteren 4 h Inkubation wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des *Tecan Infinite*® 200Pro bestimmt ($\lambda_{\text{Anregung}} = 540$ nm, $\lambda_{\text{Emission}} = 590$ nm). Jede Konzentration wurde in technischen Triplikaten getestet, deren arithmetisches Mittel der Fluoreszenzintensität in die Auswertung einging. Außerdem wurden jeweils in Triplikaten die Fluoreszenzintensitäten von drei Kontrollen bestimmt. Die DMSO-Kontrolle enthielt anstelle der Lösung der Testsubstanzen eine äquivalente Menge an DMSO. Eine EC_{100} -Kontrolle wurde mit 100 nM Pentamidin (Isethionat-Salz) sowie ein *blank* mit Kulturmedium ohne Zellen bestimmt. Die Inhibition wurde mit Gleichung 3.7 berechnet.

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \left(100 \cdot \frac{FI - FI_{EC100}}{FI_{DMSO} - FI_{EC100}} \right) \quad \text{Gl. 3.8}$$

FI: Fluoreszenzintensität mit Testsubstanz
 FI_{DMSO} : Fluoreszenzintensität der DMSO-Kontrolle
 FI_{EC100} : Fluoreszenzintensität bei maximaler Inhibition durch 100 nM Pentamidin

Vorbereitung der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie von Trypanosomen

Kurzgefasst wurden Trypanosomen in 3 % Paraformaldehyd fixiert, mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen, und in einer eiskalten, wässrigen BSA-Lösung suspendiert. Zellen wurden auf Objektträgern (12 wells, 5 mm) übertragen, über Nacht getrocknet und am nächsten Tag

wieder in PBS hydratisiert. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit jeweils 10 µl der verwendeten Lösungen behandelt. Waschsschritte erfolgten in einer mit PBS gefüllten Kammer für Objektträger, wobei nach 5 min der Puffer ausgetauscht wurde. Wenn interne Antigene detektiert werden sollten, wurden die Zellen zum Permeabilisieren mit 10 µl Triton™ X-100 (0,5 % in PBS) versetzt. Anschließend wurden die Zellen auf den Objektträgern dreimal mit PBS gewaschen. Falls die Zellen nicht permeabilisiert wurden, erfolgte direkt der *blocking*-Schritt für 15 min mit fetalem Rinderserum (FBS) (50 % in PBS). Anschließend wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen. Im Falle der Verwendung eines Steptavidin-Konjugats zur Detektion eines biotin-gekoppelten Pentamidin-Derivats (3.5) erfolgte nur ein kurzes Abspülen mit PBS.

Für eine Detektion wurden sowohl ein Streptavidin-Alexa-Fluor®-488-Konjugat (Invitrogen) als auch ein monoklonaler, muriner Anti-Biotin-Antikörper (Jackson ImmunoResearch/Strattech Scientific, UK) in Kombination mit einem Alexa Fluor® 488 gekoppelten Anti-Maus-Sekundärantikörper aus der Ziege (Thermo Scientific, UK) getestet. Letzterer wurde in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Für die Primärmarkierung wurden verschiedene Verdünnungen ausgetestet. Diese wurden jeweils in einer Lösung von 3 % FBS in PBS angesetzt und für 1 h bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Am Ende der Inkubation sowie beim Wechsel vom Primär- auf den Sekundärantikörper wurden die Objektträger jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurden diese mit *Vectashield* mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Vector Laboratories, US) versetzt und mit einem Deckgläschen verschlossen, dessen Ränder mit klarem Nagellack versiegelt wurden.

3.7 Berechnung von IC₅₀-Werten

Die Graphen einer IC₅₀-Bestimmung zeigen jeweils einen zwischen 0 % und 100 % normierten, gemessenen Effekt bei der gegebenen Konzentration der jeweils getesteten Substanz. Dargestellt sind jeweils das arithmetische Mittel sowie als Fehlerbalken der Standardfehler des arithmetischen Mittels (S.E.M., *standard error of the mean*). Mit Hilfe von *SigmaPlot* wurden die Werte sigmoidal (Hill-Gleichung) gefittet. Die Konzentration, bei der 50 % des gemessenen Effekts erzielt wurden, wurde aus der jeweiligen Regressionsgleichung berechnet und wird in dieser Arbeit als bestimmter IC₅₀-Wert angegeben. Der Fehler des IC₅₀-Wertes wurde als Differenz zum maximalen bzw. minimalen IC₅₀ berechnet. Der maximale IC₅₀ ergab sich nach Addition des S.E.M. zum arithmetischen Mittel und anschließende Regression. Der minimale IC₅₀ wurde analog durch Subtraktion des S.E.M. vom arithmetischen Mittel und anschließende Regression erhalten.

3.8 Statistische Auswertung

Um zu testen, ob es Hinweise auf einen signifikanten Unterschied zwischen den arithmetischen Mitteln zweier unabhängiger Datensätze gab, wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test angewendet. Ein t-Test ist auch für eine kleine Probenanzahl geeignet (de Winter, 2013). Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5 % angenommen. Die Rechnung wurde mit der Datenanalyse-Funktion von *Excel* durchgeführt. Wenn der empirische t-Wert größer war als der kritische t-Wert ($p = 0,95$; $f = n_1 + n_2 - 2$) war, wobei p für das Signifikanzniveau, f für die Freiheitsgrade und n für den Umfang der Messreihe steht, so deutete dies auf einen Unterschied zwischen den arithmetischen Mitteln hin. Als statistische Voraussetzung musste eine Normalverteilung jedes Datensatzes und eine Varianzhomogenität zwischen den Datensätzen erfüllt sein (Siegel, 1957). Auf Letzteres wurde mit einem F-Test ($p = 0,95$) geprüft. Mit Hilfe des David-Hartley-Pearson-Tests ($p = 0,95$) wurde die Normalverteilung eines Datensatzes abgeschätzt. Die Prüfgröße, welche aus dem Verhältnis zwischen dem Probenumfang und der Standardabweichung berechnet wurde (David *et al.*, 1954), musste für die Annahme einer Normalverteilung innerhalb der kritischen Intervallgrenzen liegen. Für diese sind auch für einen kleinen Probenumfang (≥ 3) kritische Werte tabelliert (Pearson & Stephens, 1964).

4 Ergebnisse

4.1 Ein zellfreies Produktionssystem zur Strukturaufklärung von PfCRT

Verschiedene PfCRT-Isoformen werden weltweit mit regional auftretenden Resistenzen von *P. falciparum* Malaria Parasiten gegen den Arzneistoff Chloroquin (CQ) assoziiert (Fidock *et al.*, 2000). Da der PfCRT selbst ein potenzielles Wirkstoffziel darstellt (1.3), wurde das Wildtyp-Protein PfCRT^{3D7} als Kandidat für eine Strukturaufklärung ausgewählt. Dieses wird in diesem Abschnitt (4.1) zur Vereinfachung nur PfCRT genannt. Die klassische Methode der Kristallisation als Protein-Detergens-Komplex wurde für eine Strukturanalyse von PfCRT zunächst angestrebt. Eine Strukturaufklärung mittels Kryo-EM wurde ebenfalls vorbereitet. Als Produktionssystem wurde das CF-System in der Detergenzien basierten Variante gewählt. Als amphiphile Moleküle lagern sich Detergenzien an die hydrophobe Oberfläche von MPs an und bilden einen wasserlöslichen Protein-Mizellen-Komplex (Le Maire *et al.*, 2000). Das gewählte Detergens beeinflusst die Faltung eines MPs und somit seine Aktivität und Stabilität in Abwesenheit einer Lipidmembran (Privé, 2007). Für jeden Schritt im Prozess bis zur Strukturaufklärung muss ein geeignetes Detergens empirisch gefunden werden (Rothnie, 2016). In dem von Stetsenko und Guskov (2017) analysierten Zeitraum von 2006-2016 wurden beispielsweise nur in etwa 50 % der Fälle dasselbe Detergens für die Reinigung und die Kristallisation verwendet.

4.1.1 Das Kernstück der zellfreien Proteinproduktion: Der S30-Ribosomen-Extrakt

Es wurde eine in der Arbeitsgruppe etablierte Methode zur zellfreien Proteinproduktion auf Basis eines Translationssystems aus *E. coli* verwendet (Holm-Bertelsen *et al.*, 2016; Müller-Lucks *et al.*, 2012; Müller-Lucks *et al.*, 2013). Für einen S30-Ribosomen-Extrakt wurden fünf Liter BL21(DE3) *E. coli* fermentiert (3.3.1). Da die Ribosomenkonzentration in Bakterien von der Wachstumsrate abhängt (Zawada & Swartz, 2006; Bremer & Dennis, 2008), wurden die Ribosomen aus schnell wachsenden Zellen isoliert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde der Fermentationsprozess durch schnelles Kühlen auf Eis gestoppt.

Die Veränderung der Inprozess-Parameter von vier Fermentationsprozessen, die mit zeitlichem Abstand und mit unterschiedlichen ausführenden Personen ausgeführt wurden, sind in Abb. 4.1 (A-C) dargestellt. Der Fermentationsprozess im Bioreaktor war robust und kontrollierbar. Die Zelldichte verdoppelte sich etwa alle 29 min in der exponentiellen Wachstumsphase. Den Beginn dieser Phase kennzeichnete auch ein leichtes, aber stetiges Ansäuern des Mediums. Insgesamt nahm der pH-Wert des Mediums jedoch nur geringfügig um $(0,07 \pm 0,01)$ pH-Einheiten vom Beginn bis zum Stopp des Fermentationsprozesses ab. Im Gegensatz dazu sank die über den Sauerstoff-Sensor gemessene Sauerstoffsättigung des Mediums bereits von Beginn der Fermentation annähernd linear um $(0,15 \pm 0,01) \% \text{ min}^{-1}$.

Etwa 5 h nach Inokulation wurden die Zellen geerntet und gewaschen. Etwa 31-37 g Zellen (Feuchtmasse) wurden so aus fünf Liter Kultur erhalten und ergaben nach Zellaufschluss, schrittweiser Zentrifugation und Dialyse der Rohextraktes etwa 15 ml S30-Extrakt.

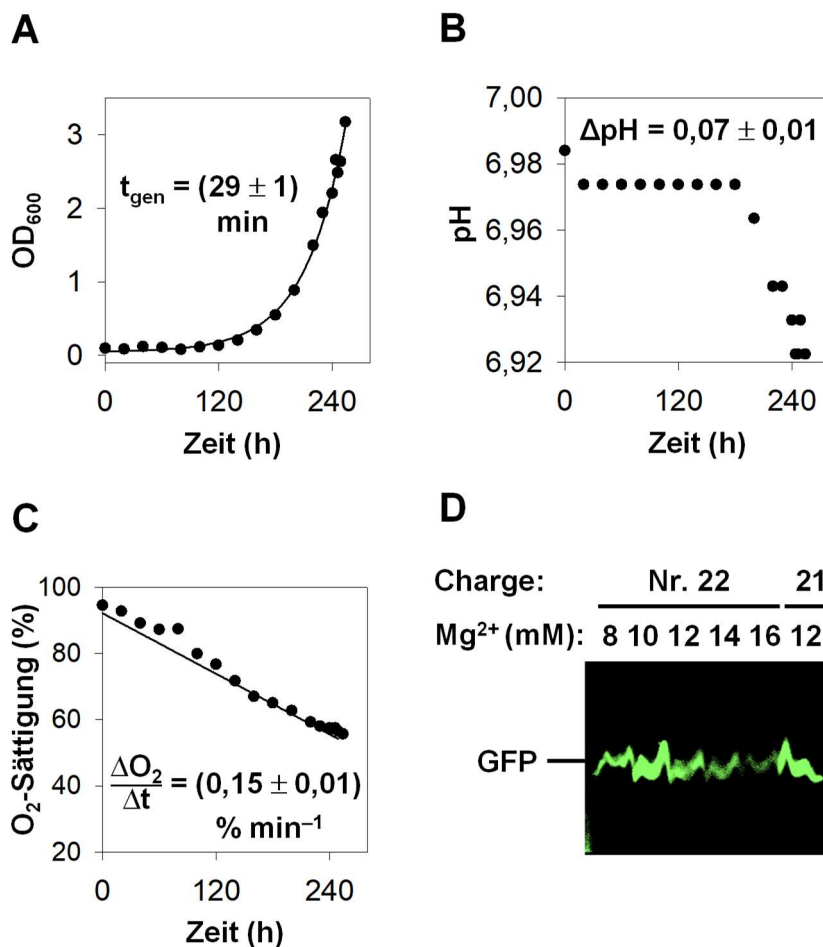


Abb. 4.1 In-Prozess-Kontrollen bei der S30-Extrakt-Herstellung. Mit Eintreten in die exponentielle Wachstumsphase (A) verdoppelten sich die BL21(DE3) *E. coli* etwa alle 29 min und (B) das Medium säuerte sich leicht an. (C) Die Sauerstoffsättigung sank kontinuierlich mit Beginn der Fermentation. Die Veränderung der genannten Parameter ist am Beispiel der Fermentation für die S30-Extrakt-Charge Nr. 21 (interne Nummerierung) gezeigt. Die angegebene Generationszeit sowie die Änderung des pH-Wertes und der Sauerstoffsättigung stellen jeweils das arithmetische Mittel \pm S.E.M. aus insgesamt vier Fermentationsprozessen dar. (D) Fluoreszenz von zellfreiem GFP im SDS-PAGE-Gel (Belichtung: 100 ms; *ChemoStar ECL & Fluorescence Imager*) zur Ermittlung einer optimalen Mg²⁺-Konzentration und zur Qualitätsbeurteilung einer neuen S30-Extrakt-Charge, gezeigt am Beispiel der neuen Charge Nr. 22 im Vergleich zu der vorherigen Charge Nr. 21.

Die Eignung einer neu produzierten Charge für die zellfreie Produktion wurde durch eine Testexpression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Vergleich zu einer älteren Charge verifiziert. Anhand der Fluoreszenzintensität wurde die Qualität der Extrakte bewertet. Die Qualität blieb konstant mit zuvor produzierten Chargen vergleichbar. Zugleich wurde die optimale Mg²⁺-Konzentration ermittelt. Mg²⁺ gehört mit K⁺ zu den dominierenden divalenten bzw. monovalenten intrazellulären Ionen, die zudem von Ribosomen gebunden werden

(Rozov *et al.*, 2019; Schuwirth *et al.*, 2005). Sie tragen maßgeblich zur Integrität, Faltung und Funktion der Ribosomen bei (Nierhaus, 2014) und stabilisieren als Gegenion zum negativ geladenen Phosphat RNAs und NTPs (Klein *et al.*, 2004; Maguire & Cowan, 2002; Nierhaus, 2014; Rozov *et al.*, 2019). Zusätzlich ist Mg^{2+} für die Transkription durch die T7 RNA-Polymerase (Chamberlin & Ring, 1973) und weiterer beteiligter Enzyme des zellfreien System essenziell (Schwarz *et al.*, 2007). Für ein effizientes *in-vitro*-System ist die Konzentration dieser Ionen folglich von hoher Bedeutung. Die K^+ -Konzentration wurde konstant für alle CF-Produktionen auf 290 mM eingestellt. Sie war nicht Gegenstand einer weiteren Optimierung, nachdem eine Anpassung von 269 mM K^+ auf 290 mM K^+ in einer Testexpression von GFP in Doppelbestimmung zu einer Steigerung der Fluoreszenz um bis zu 50 % führte. Die Fluoreszenz von GFP im SDS-PAGE-Gel indizierte die optimale Mg^{2+} -Konzentration einer neuen Extrakt-Charge (Abb. 4.1, D). Für die hergestellten S30-Extrakt-Chargen wurden Optima bei 10 mM oder 12 mM Mg^{2+} bestimmt. Diesen Konzentrationsbereich (10-20 mM Mg^{2+}) gibt auch Schwarz *et al.* (2007) für einen *E. coli* basierten Extrakt an.

4.1.2 Brij® 78 ermöglicht die zellfreie Produktion von PfCRT

Die Bedingungen für die zellfreie Produktion von PfCRT wurden von der Autorin bereits im Rahmen einer Masterarbeit (Petersen, 2017) ermittelt. PfCRT wurde dabei als GFP-Fusionsprotein hergestellt. Ein C-terminales GFP diente als Faltungsindikator und ermöglichte zusätzlich eine schnelle Aussage zur Eignung der getesteten Detergenzien für die detergenzienbasierte zellfreie Produktion von MPs (Müller-Lucks *et al.*, 2012). Der GFP-Fluorophor bildet sich nur bei korrekter Faltung aus (Cody *et al.*, 1993). Im Fall eines C-terminalen GFP-Fusionsproteins ist die Fluoreszenz zusätzlich abhängig von der Faltung des N-terminal gelegenen Proteins und indiziert somit die Faltung des gesamten Proteins (Waldo *et al.*, 1999). Die GFP-Fluoreszenz ist bei milder Probevorbereitung bei 37 °C zudem stabil gegenüber SDS, wodurch eine Analyse der Fluoreszenz auch nach elektrophoretischer Trennung im SDS-PAGE-Gel erfolgen kann (Drew *et al.*, 2006; Geertsma *et al.*, 2008; Müller-Lucks *et al.*, 2012).

Eine Eignung von in der Strukturaufklärung etablierten Detergenzien für die zellfreie Produktion würde eine Vereinfachung des Produktionsprozesses durch Verzicht eines Detergenzienwechsels darstellen. Um Alternativen zu Brij® 78 zu ermitteln, wurden noch drei weitere Detergenzien auf ihre Eignung untersucht, PfCRT zellfrei zu produzieren. Da sich keine Voraussagen zur Eignung machen lassen, wurden Detergenzien ausgewählt, die in der detergenzienbasierten zellfreien Produktion und in der Strukturaufklärung bereits erfolgreich eingesetzt wurden. Die Strukturformeln von Brij® 78 sowie der anderen ausgewählten, nichtionischen Detergenzien *n*-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM), 2,2-Didecylpropan-1,3-bis- β -D-maltopyranosid (LMNG) und Triton™ X-100 sind in Abb. 4.2 (A) gezeigt.

Triton™ X-100, welches wie Brij® 78 eine hydrophile Polyethylenglykolkette besitzt, wird häufiger in der Reinigung von Proteinen als für ihre Kristallisation eingesetzt (Stetsenko & Guskov, 2017). Im Gegensatz zu Brij® 78, dem generell eine gute Solubilisierung von MPs im CF-System bescheinigt wird (Schwarz *et al.*, 2007), wurden mit Triton™ X-100 bisher nur vereinzelt MPs erfolgreich zellfrei hergestellt. Dabei wurden schon gute Ausbeuten von bis zu 1 mg ml^{-1} Reaktionsmix erreicht (Klammt *et al.*, 2005). Für DDM sind ebenfalls schon zellfreie Produktionen von MPs beschrieben (Klammt *et al.*, 2005). Es gilt zugleich als das erfolgreichste Kristallisationsdetergens (Stetsenko & Guskov, 2017). Als neuartiges Detergens, dessen Struktur einem doppelten DDM-Molekül ähnelt, wurde LMNG ausgewählt. Seine vielseitigen Anwendungsgebiete umfassen unter anderem die Extraktion von MPs aus nativen Membranen, ihre Reinigung und Kristallisation und der Einsatz bei der Proteinstrukturaufklärung mittels Kryo-Elektronenmikroskopie (Breyton *et al.*, 2019). Auch der Einsatz in einer zellfreien Synthese unter Verwendung eines Weizenkeimextraktes ist beschrieben (Chae *et al.*, 2010).

In Anwesenheit der genannten Detergenzien wurde PfCRT-GFP Δ M1-His₁₀ in einem analytischen Maßstab zellfrei produziert (3.3.2) und anschließend mit einer IMAC über den His₁₀-tag an Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni²⁺-NTA) gereinigt (3.3.3). Zur Reinigung wurde ein TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4) mit 150 mM NaCl und 0,05 % DDM verwendet. Nach zwei Waschschritten mit 75 μ l Puffer (+ 20 mM Imidazol) wurden die Zielproteine in 80 μ l Puffer (+ 400 mM Imidazol) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Auf vollständige Synthese und Faltung des Fusionsproteins wurde durch Anregung der GFP-Fluoreszenz im Gel sowie durch Chemilumineszenz-Detektion des C-terminalen Histidin-tags nach einem Western Blot geprüft (3.2.2). Eine Coomassie®-Brillant-Blau-Färbung detektierte unspezifisch alle im SDS-PAGE-Gel getrennten Proteine. Brij® 78 diente als Kontrolle und führte erwartungsgemäß zu einem vollständigen GFP-Fusionsprotein mit ausgeprägter In-Gel-Fluoreszenz (Abb. 4.2, B). Im Anti-Penta-His-Western Blot sowie im Coomassie®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE wurde eine für GFP-Fusionsproteine charakteristische Doppelbande beobachtet (Geertsma *et al.*, 2008; Müller-Lucks *et al.*, 2012) (Abb. 4.2, C und D), deren Laufhöhen scheinbaren Proteinmassen von etwa 77 kDa und 66 kDa entsprechen. Diese Doppelbande lässt sich PfCRT-GFP Δ M1 mit seiner theoretischen Masse von 82,4 kDa zuweisen, welches in zwei unterschiedlichen Faltungsformen im Gel migrierte. Das scheinbar kompaktere, etwa 10 kDa kleinere Protein ließ sich zur Fluoreszenz im Gel anregen und stellt damit den vermutlich korrekt gefalteten Anteil des Fusionsproteins dar, da sich der Fluorophor im C-terminalen GFP ausbilden konnte. Zusätzlich wurde eine fluoreszierende Bande zwischen der 130-kDa- und der 250-kDa-Markerbande beobachtet, welche ein vermutliches SDS-resistentes Dimer von PfCRT-GFP Δ M1-His₁₀ darstellt. Aufgrund des deletierten Startmethions wurde GFP als lösliches Protein nur in Spuren produziert.

4.1.3 Affinitätschromatographie: Einfluss von Pufferzusätzen und Detergenzien

Glycerol und NaCl steigern die Effektivität der IMAC

Nach der Etablierung von Brij® 78 als Detergens für die CF-Produktion wurden im nächsten Schritt geeignete Detergenzien für eine Solubilisierung während der Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA (IMAC, 3.3.3) ermittelt. Für diese Fragestellung war die C-terminale Fusion mit GFPΔM1 nicht mehr erforderlich. Um eine Auswahl an Detergenzien mit unterschiedlichen Eigenschaften zur Verfügung zu haben, wurden mehrere Detergenzien in diesem Abschnitt und im nächsten Abschnitt 4.1.4 für die Solubilisierung und Stabilisierung von PfCRT untersucht.

In Vorarbeiten (Petersen, 2017) waren bereits die Detergenzien DDM, *n*-Dodecyl-*N,N*-Dimethylamin-*N*-oxid (LDAO) und *n*-Octyl-β-D-Glucopyranosid (β-OG) für die IMAC von PfCRT-His₁₀ ausgetestet worden. Diese gehören zu den erfolgreichsten Detergenzien für die Kristallisation von MPs (Stetsenko & Guskov, 2017). Allerdings verblieb ein Großteil des hergestellten Proteins auf der Ni²⁺-NTA-Matrix. Für eine Strukturaufklärung mittels Kristallisation werden Proteinkonzentrationen von 10 mg ml⁻¹ empfohlen (Newby *et al.*, 2009; Wiener, 2004). Um eine solche Konzentration nach einem mehrteiligen Arbeitsprozess zu erreichen, bei dem ein Probenverlust zu erwarten ist, war eine Steigerung der Reinigungseffektivität notwendig. Ausgehend vom bisherigen besten Reinigungsergebnis bei Verwendung eines TRIS-Puffers (20 mM, pH 7,4), dem 150 mM NaCl und 0,05 % DDM zugesetzt waren, wurden die Pufferzusätze variiert. Durch Glycerolzusatz und Erhöhung der Salzkonzentration sollen unspezifische Bindungen von Fremdproteinen zur Matrix zurückgedrängt werden können (Bornhorst & Falke, 2000). Ob PfCRT zusätzlich zur spezifischen Bindung über den His₁₀-tag unspezifisch an die Ni²⁺-NTA-Matrix bindet, wurde durch Variation dieser zwei Parameter im Zusammenspiel mit der Detergens-Konzentration überprüft.

Nach der zellfreien Produktion von PfCRT-His₁₀ in 1 ml *reaction mixture* (RM) (3.3.2) wurde der RM in bis zu sechs Anteile aufgeteilt und in den folgenden Schritten der IMAC mit den Test-Puffern behandelt (3.3.3). Ein Western Blot und eine Coomassie®-Brillant-Blau gefärbtes SDS-PAGE-Gel (3.2.2) zeigen, dass PfCRT-His₁₀ auf einer Laufhöhe mit einer scheinbar niedrigeren Masse im Gel migrierte, als seiner theoretischen Masse von 51 kDa entspricht (Abb. 4.3, A und B) (Petersen, 2017). Viele MPs zeigen ein *gel-shifting*-Verhalten, wobei positive wie negative Abweichungen auftreten können (Rath & Deber, 2013). Auffällig ist die Proteinleiter, in der PfCRT im SDS-PAGE-Gel auftrat. Eine zu einem Dimer passende Bande wurde auch immunologisch nachgewiesen und wird in einem späteren Abschnitt gesondert behandelt (siehe 4.1.5).

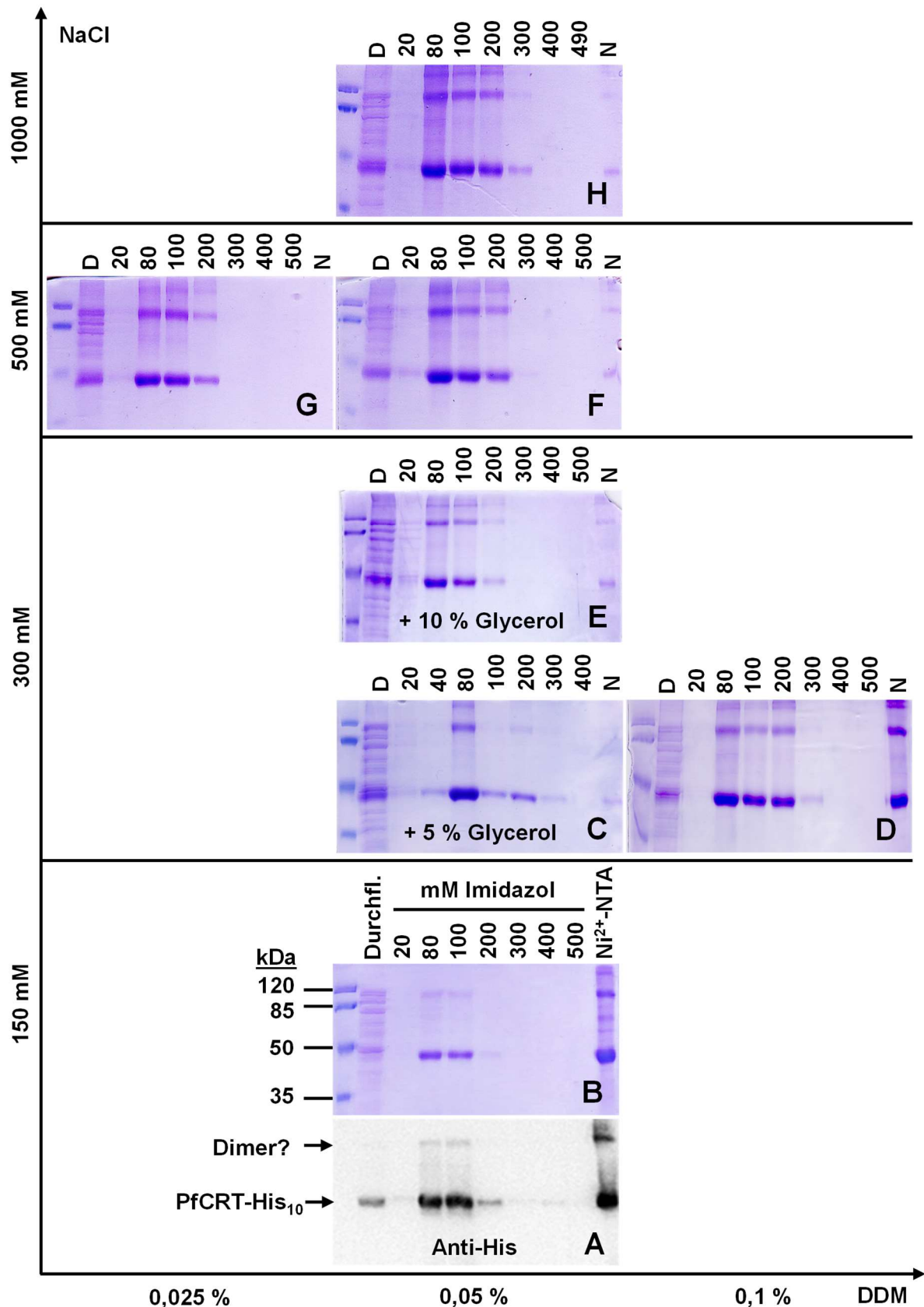


Abb. 4.3 Zusätze zum TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4) beeinflussen die Effektivität der IMAC von PfCRT-His₁₀ (51 kDa) an Ni²⁺-NTA. Gezeigt sind (A) ein Anti-Penta-His-Western Blot (Belichtung: 1,5 s; *Lumi ImagerTM F1*) sowie (B-H) mit Coomassie®-Brillant-Blau gefärbte SDS-PAGE-Gele der Reinigungsfractionen der IMAC bei den angegebenen Pufferbedingungen.

Durch den Vergleich mit dem spezifischen Nachweis über den Anti-Penta-His-Antikörper sind die Banden in den *Coomassie*®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gelen eindeutig PfCRT-His₁₀ zuzuordnen. Da die Spezifität und Empfindlichkeit eines Western Blots im Folgenden nicht benötigt wurde, wurde die Reinigungseffektivität mit Hilfe der *Coomassie*®-Färbemethode beurteilt. Die erhaltenen SDS-PAGE-Gele sind in Abb. 4.3 in ein Koordinatensystem einsortiert, bei dem auf der Abzisse die DDM-Konzentration (0,025-0,01 %) sowie auf der Ordinate die NaCl-Konzentration (150-1000 mM) aufgetragen sind. Nur solubilisierte Proteine können die Fritte bei der IMAC passieren. Präzipitate sowie die Ni²⁺-NTA-Matrix verbleiben auf der Fritte. Mehrere Bedingungen führten zu einer deutlichen Verbesserung der Reinigungseffektivität. Bei gleichbleibender DDM-Konzentration beeinflusste insbesondere die Ionenstärke über den NaCl-Zusatz zum TRIS-Puffer das Bindungsverhalten zur Ni²⁺-NTA-Matrix. Eine alleinige Erhöhung der NaCl-Konzentration von 150 mM auf 500 mM NaCl führte zu einer deutlichen Reduktion des auf der Matrix verbleibenden Zielproteins PfCRT-His₁₀ (Abb. 4.3, F). Eine Erhöhung von 500 mM NaCl erlaubte auch die Reduktion der DDM-Konzentration um die Hälfte auf 0,025 % ($\approx 3 \times \text{CMC}$ in Wasser), ohne die Reinigungseffektivität zu verschlechtern (Abb. 4.3, G). Die Salzkonzentration wirkt sich auf die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC, *critical micelle concentration*) aus, die dadurch erniedrigt wird (Wan & Poon, 1969). Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 1000 mM führte zu keiner weiteren Verbesserung gegenüber einer Konzentration von 500 mM NaCl (Abb. 4.3, H).

Bei zweifacher DDM-Konzentration (0,1 % $\approx 12 \times \text{CMC}$) und leicht erhöhter Salzkonzentration (300 mM NaCl) wurde PfCRT-His₁₀ weiterhin als kräftige Bande in der Matrix-Fraktion detektiert (Abb. 4.3, D). Dies weist daraufhin, dass die ursprüngliche schlechte Reinigungseffektivität nicht durch eine ungenügende Solubilisierung, sondern eher durch unspezifische Bindungen zur Matrix verursacht wurde. Auch in Vorarbeiten (Petersen, 2017) vermittelte selbst SDS, welches als maximale Solubilisationskontrolle betrachtet werden kann, keine Ablösung von PfCRT-His₁₀ von der Ni²⁺-NTA-Matrix, als ein Puffer mit niedrigem Salzgehalt verwendet wurde. Mit dieser Theorie konform bewirkte ein Glycerolzusatz von 5 % bzw. 10 % in Kombination mit 300 mM NaCl und 0,05 % DDM eine fast vollständige Elution von der Matrix (Abb. 4.3, C und E).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der IMAC von PfCRT-His₁₀ mit DDM auf eine unspezifische Bindung zur Matrix, welche sich durch mindestens 500 mM NaCl oder den Zusatz von 5 % Glycerol bei 300 mM NaCl im TRIS-Puffer zurückdrängen ließen. Ein positiver Effekt auf die Proteinstabilität und Löslichkeit ist zudem durch diese Zusätze zu erwarten (Gräslund *et al.*, 2008).

IMAC: Milde Detergenzien solubilisieren PfCRT

Nach der Optimierung der Pufferzusammensetzung unter Verwendung von DDM als Beispiel-Detergens wurden die Erkenntnisse auf die Testung weiterer Detergenzien übertragen. Detergenzien lassen sich nach Privé (2007) aufgrund ihrer Struktur in harsche bis milde Detergenzien einteilen (Abb. 4.4). Detergenzien mit einer kleinen Kopfgruppe (Michel, 2001) und einer kurzen Alkylkette (Parker & Newstead, 2016; Sonoda *et al.*, 2010) lassen potenziell mehr Interaktionsflächen am Protein für eine Kristallisation frei, wodurch diese Kristalle eher mit einer höheren Auflösung beugen. Dies trifft auf LDAO und β -OG zu, die zu den vier erfolgreichsten Kristallisationsdetergenzien gehören (Stetsenko & Guskov, 2017). Mit ihnen wurden durchschnittlich die höchsten Auflösungen (β -OG: 2,5 Å; LDAO: 2,7 Å) erzielt (Parker & Newstead, 2016). Zugleich sind sie als eher harsch, also potenziell denaturierend, zu bewerten. Michel (2001) schätzt, dass LDAO aufgrund seines denaturierenden Potenzials nur bei 20 % der MPs verwendet werden kann. Die Ladung der Kopfgruppe beeinflusst ebenfalls die Proteinstabilität. Aufgrund der destabilisierenden Effekte gelten permanent geladene Detergenzien als nicht einsetzbar, während zwitterionische Detergenzien für stabilere MPs in Frage kommen (Michel, 2001). Zu den mildesten Detergenzien zählen die nichtionischen, maltosidischen Detergenzien wie DDM mit einer C_{12} -Alkylkette und *n*-Decyl- β -D-maltopyranosid (DM) mit einer C_{10} -Alkylkette. DDM ist das Detergens mit dem die meisten MP-Kristallstrukturen gelöst wurden (Newstead *et al.*, 2008; Stetsenko & Guskov, 2017). Lange Alkylketten sollen die Zellmembran imitieren (Iwata & Byrne, 2003). Daher erhöht sich in einer homologen Reihe der stabilisierende Effekt mit Zunahme der Methylengruppen in der Alkylkette (Michel, 2001).

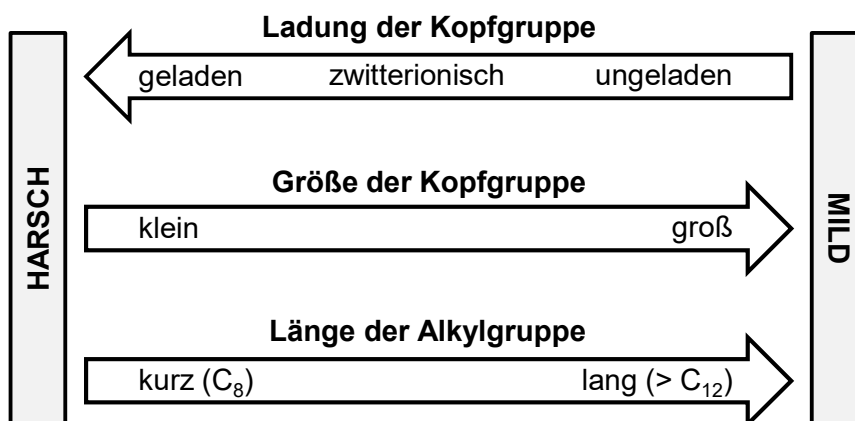


Abb. 4.4 Einteilung von Detergenzien basierend auf ihrer Struktur nach Privé (2007).

Aufgrund historischer Protokolle und erfolgreicher Verwendung könnte die Detergenswahl voreingenommen sein (Kotov *et al.*, 2019). Neben den vier erfolgreichsten Kristallisationsdetergenzien DDM, DM, β -OG und LDAO wurden daher noch vier historisch weniger etablierte und strukturell verschiedene Detergenzien auf ihre Eignung getestet, zellfreies PfCRT zu

solubilisieren und stabilisieren: *n*-Dodecylphosphocholin (Foscholin-12, FCH-12), 5-Cyclohexyl-1-pentyl- β -D-maltosid (Cymal-5), Brij® 78 und LMNG. Die CMC und die Mizellgröße der getesteten Detergenzien sind in Tab. 4.1 aufgeführt. Zur Solubilisierung wurden diese in Konzentrationen oberhalb ihrer CMC eingesetzt. Zum Zurückdrängen unspezifischer Bindungen an die Matrix wurde die NaCl-Konzentration im TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4) zu 500 mM gewählt. Diese Bedingung sollte ermöglichen, die Eignung eines getesteten Detergens für die IMAC von PfCRT-His₁₀ eindeutig zu bewerten.

Tab. 4.1 CMC und Mizellgröße der getesteten Detergenzien.

Abkürz.	Vollständiger Name	CMC, % (m/V)	Referenz	Mizellgröße, kDa	Referenz
Brij® 78	Polyoxyethylen-(20)-stearyl-ether	0,005	Klammt <i>et al.</i> (2005)	67*	Moore <i>et al.</i> , 2007
Cymal-5	5-Cyclohexyl-1-pentyl- β -D-maltosid	0,12	Anatrace**	23	D'Avanzo <i>et al.</i> (2013)
DM	<i>n</i> -Decyl- β -D-maltopyranosid	0,087	Baker <i>et al.</i> (2015)	33	Baker <i>et al.</i> (2015)
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltopyranosid	0,0087	Baker <i>et al.</i> (2015)	72; 53 (20-95)	Strop & Brunger (2005); Chaptal <i>et al.</i> (2017) (Chaptal <i>et al.</i> , 2017)
FCH-12	<i>n</i> -Dodecylphosphocholin	0,047	Anatrace	38 (16-65)	Chaptal <i>et al.</i> (2017)
LDAO	<i>n</i> -Dodecyl- <i>N,N</i> -Dimethylamin- <i>N</i> -oxid	0,023	Anatrace	22	Strop & Brunger (2005)
LMNG	2,2-Didecylpropan-1,3-bis- β -D-malto-pyranosid	0,001	Anatrace	393 (235-622)	Chaptal <i>et al.</i> (2017)
β -OG	<i>n</i> -Octyl- β -D-glucopyranosid	0,67- 0,73; 0,53-0,76	Baker <i>et al.</i> (2015); Lorber <i>et al.</i> (1990)	8; 22-30	Lorber <i>et al.</i> (1990)

Bemerkung: * auf Basis der Aggregationszahl und des Molekulargewichts; **Anatrace = Hersteller der Detergenzien (www.anatrace.com, o. D.)

PfCRT-His₁₀ wurde im präparativen Maßstab zellfrei produziert (3.3.2) und der RM anschließend anteilig mit den Testpuffern und Ni²⁺-NTA inkubiert (3.3.3). Die mit Coomassie®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gele der IMAC-Fraktionen sowie die Strukturen der getesteten Detergenzien sind in Abb. 4.5 und Abb. 4.6 gezeigt. Zusammen mit dem bereits zuvor getesteten DDM führte insgesamt die Hälfte der acht getesteten Detergenzien zu einer fast vollständigen Wiederfindung von PfCRT-His₁₀ in den Elutionsfraktionen. Die ungeeigneten Detergenzien lassen sich nach ihrer Struktur als eher harsch einsortieren. Trotz verbesserter Pufferbedingungen solubilisierten LDAO und β -OG PfCRT-His₁₀ nicht ausreichend (Abb. 4.5, A und B). Bemerkenswert ist der direkte Vergleich des Reinigungsergebnisses von DDM und DM, welche einer homologen Reihe zuzuordnen sind und sich nur in der Länge ihrer Alkylkette unterscheiden. Mit DDM wurde PfCRT-His₁₀ fast vollständig von der Matrix eluiert. Mit dem um

zwei Methyleinheiten kürzeren DM befand sich PfCRT-His₁₀ als kräftige, blaue Bande in der Matrix-Fraktion. Trotz des ergänzenden Zusatzes von 10 % Glycerol zu den 500 mM NaCl im TRIS-Puffer wurde das Zielprotein nur in Spuren eluiert (Abb. 4.5, C). Auch das spezielle Maltosid-Detergens Cymal-5 mit einem Cyclohexylpentyl-Rest war ungeeignet (Abb. 4.5, D).

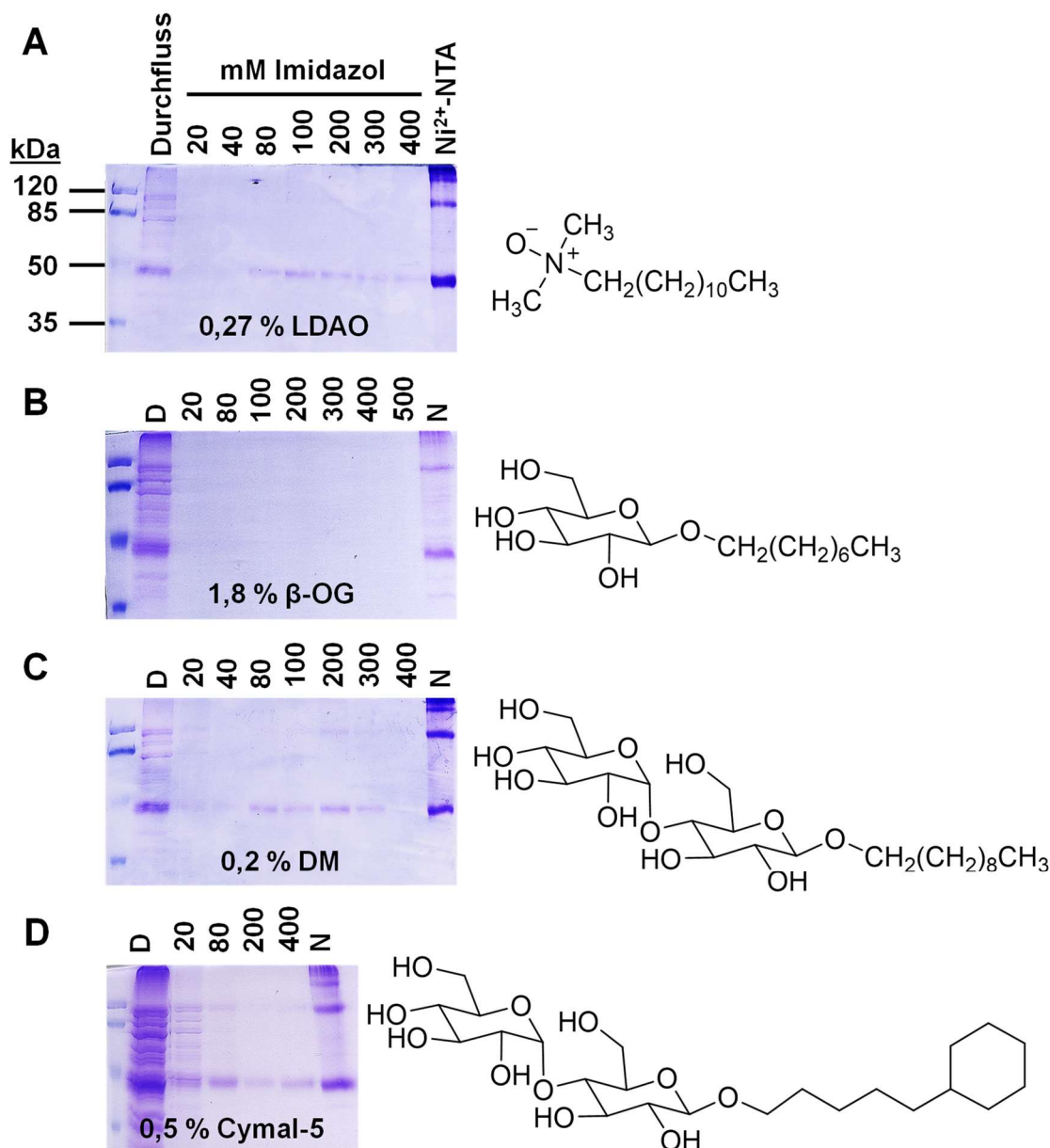


Abb. 4.5 Ungeeignete Detergenzien für die IMAC von PfCRT-His₁₀ an Ni²⁺-NTA. Gezeigt sind die mit Coomassie®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gele der Reinigungsfractionen sowie die Strukturen der Detergenzien. Dem TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4 wurden zusätzlich zu 500 mM NaCl in (A) 0,27 % LDAO, 10 % Glycerol, in (B) 1,8 % β -OG, in (C) 0,2 % DM, 10 % Glycerol und in (D) 0,5 % Cymal-5 zugesetzt.

Das ebenfalls nichtionische Brij® 78 kennzeichnet eine lange hydrophile Polyethylenglykolkette und eine lange C₁₈-Alkylkette. Auch das zwitterionische FCH-12 ist als mild zu bewerten. Es zählt zu den lipidähnlichen Detergenzien, da die Struktur seiner hydrophilen Kopfgruppe sowie die verhältnismäßig lange C₁₂-Alkylkette die in biologischen Membranen weit verbreitet vorkommenden Phosphatidylcholin-Lipide nachahmt (Chipot *et al.*, 2018).

Durch die Anpassung der Pufferzusammensetzung und Identifikation geeigneter Detergenzien wurde eine Ausbeute an affinitätsgereinigtem Protein von 1-1,8 mg pro ml RM erhalten (Abb. 4.7). Unterschiede in der Proteinmenge sind vor allem auf eine leicht schwankende Effizienz der CF-Produktion zurückzuführen. Damit zeigte die CF-Produktion und IMAC von PfCRT, dass die zuvor genannte quantitative Anforderung für eine Strukturaufklärung grundsätzlich erfüllt werden kann.

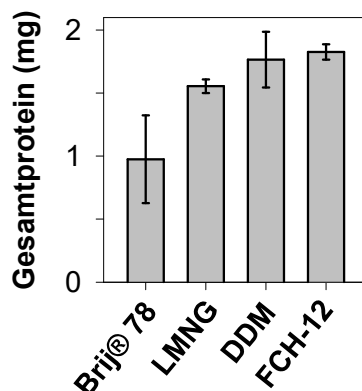


Abb. 4.7 Gesamtprotein in den Elutionsfraktionen der IMAC von PfCRT-His₁₀ pro ml RM. Dargestellt sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung von 2 (Brij® 78, LMNG, FCH-12) bis 3 (DDM) zellfreien Produktionen, die mit dem genannten Detergens unter ähnlichen Bedingungen gereinigt wurden. Die Werte beziehen sich auf 1 ml RM.

Das neuartige Detergens LMNG solubilisiert PfCRT auch in minimaler Konzentration

Neben einer Kristallisation als Protein-Detergens-Komplex wurde eine elektronenmikroskopische Methode zur Strukturaufklärung vorbereitet. Bei der Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) werden Projektionen von vitrifizierten Proben in einer quasi-nativen Konformation erhalten, welche bei randomisierter Anordnung der Partikel zu einem dreidimensionalen Modell verrechnet werden (Kühlbrandt, 2014b). Der Kontrast und das Signal-Rausch-Verhältnis hängen von der Pufferzusammensetzung ab. Hohe Konzentrationen gelöster Substanzen wie Salz und Glycerol erniedrigen diese, da die Elektronen an ihren Atomen genauso stark streuen können wie am Biomolekül (Thonghin *et al.*, 2018). Auch können bei der EM leere Detergensmizellen stören, da diese mit dem Protein-Detergens-Komplex verwechselt werden können und folglich bei der Auswertung hinderlich sind (Gewering *et al.*, 2018; Thonghin *et al.*, 2018). Für eine Anwendung in der Kryo-EM wurde LMNG vom Kooperationspartner A. Möller (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) empfohlen.

LMNG zeigte sich zuvor (Abb. 4.6, B) in einer Konzentration, die der fünffachen CMC entspricht, und in Kombination mit 500 mM NaCl als geeignet für die IMAC von PfCRT-His₁₀. Da LMNG mit 0,001 % eine äußerst niedrige CMC aufweist, kam eine Erniedrigung der Detergengkonzentration durch Dialyse zu einem späteren Zeitpunkt des Prozesses nicht in Frage. Daher wurden die hinsichtlich Detergens- und Salzkonzentration Minimalbedingungen für eine Solubilisierung von zellfreiem PfCRT-His₁₀ (3.3.2) während der IMAC (3.3.3) evaluiert. Auf einen Glycerolzusatz zum TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4) wurde aus dem zuvor genannten Grund verzichtet. Die mit Coomassie®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gele der Reinigungsfractionen sind in Abb. 4.8 gezeigt.

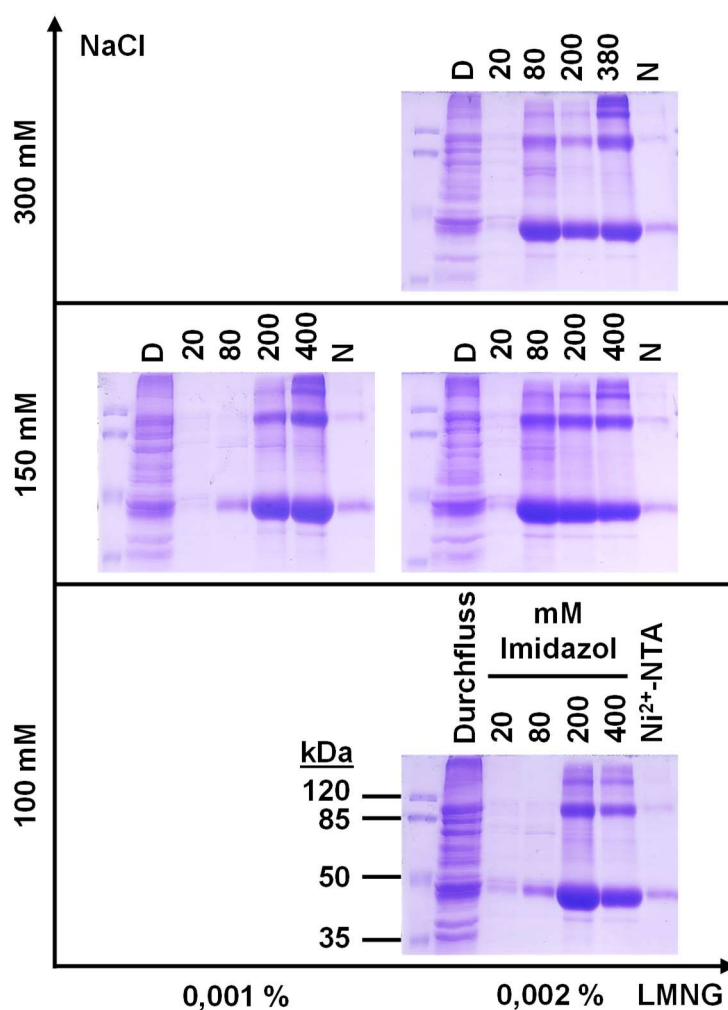


Abb. 4.8 Variation der NaCl- und LMNG-Konzentration im TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4) bei der IMAC von PfCRT-His₁₀. Dargestellt sind die Coomassie®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gele der Reinigungsfractionen.

Eine starke Affinität zur Matrix wurde unter zwei Bedingungen festgestellt, nämlich bei den Kombinationen von 100 mM NaCl und 0,002 % LMNG (2 x CMC) sowie von 150 mM NaCl und 0,001% LMNG (1 x CMC). Die höhere Affinität zeigt sich darin, dass die stärksten Monomer-Banden für PfCRT-His₁₀ in den Elutionsfraktionen mit den zwei höchsten Imidazol-

Konzentrationen (200 mM und 400 mM) detektiert wurden. Im Vergleich dazu wurde mit 500 mM NaCl und mit LMNG in fünffacher CMC zuvor nur eine sehr schwache Bande in der 400-mM-Imidazol-Elutionsfraktion erhalten (Vgl. Abb. 4.6, B).

Zusammenfassend ließ sich die Tendenz feststellen, dass mit höherer Salzkonzentration und höherer Detergentskonzentration die Affinität zur Matrix abgeschwächt wurde. Anschaulich wird dies in Abb. 4.8 beim visuellen Vergleich der Intensität und Verteilung der Monomer-Banden von PfCRT-His₁₀ bei Verwendung von LMNG in einfacher und in zweifacher CMC bei jeweils gleich hoher Salzkonzentration von 150 mM NaCl im Puffer dargestellt. Dies spiegelt die zuvor bei der Puffervariation mit DDM erhaltenen Ergebnisse, bei denen eine zu hohe Affinität zur Matrix durch die Erhöhung der Salzkonzentration im Reinigungspuffer zurückgedrängt wurde.

4.1.4 Größenausschlusschromatographie: Qualität und Stabilität von PfCRT

GFP-Fusion zur Qualitätskontrolle

Die Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA führte bereits zu einer Anreicherung des Zielproteins bei einer Abtrennung eines Großteils von Fremdproteinen aus dem RM der zellfreien Produktion (Vgl. Durchfluss-Fraktionen und Elutionsfraktionen der IMAC von PfCRT-His₁₀). Zur weiteren Steigerung der Reinheit wurde mit einer Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) ein ergänzender Reinigungsschritt durchgeführt. Die SEC beruht auf der Trennung von Partikeln mit unterschiedlichem hydrodynamischen Volumen, definiert über ihren Stokes-Radius (Kunji *et al.*, 2008).

Die Qualität von zellfreiem PfCRT als GFP-Fusionsprotein wurde zu einem späteren Verlauf des Arbeitsprozesses anhand eines SEC-Chromatogramms erneut bewertet. PfCRT-GFPΔM1-His₁₀ wurde mit Brij® 78 sowohl im präparativen Maßstab zellfrei hergestellt (3.3.2) als auch mittels IMAC gereinigt (3.3.3). Das Coomassie®-Brillant-Blau gefärbte SDS-PAGE-Gel der Reinigungsfraktionen zeigt die zuvor beschriebene, charakteristische Doppelbande eines GFP-Fusionsproteins (Abb. 4.9, A). Die Fraktionen, die 80-400 mM Imidazol enthielten, wurden vereinigt, mit einem Zentrifugierfilter (100k MWCO) konzentriert, wobei gleichzeitig der Imidazol-Gehalt erniedrigt wurde (3.3.4). Die so erhaltene Probe wurde schließlich mit dem Äktapurifier-Chromatographiesystem nach dem Größenausschlussprinzip über eine Superdex-200-10/300-GL-Säule getrennt (3.3.5). Der Detektor erfasste das Gesamtprotein über die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm sowie das GFP-Chromophor über die Absorption bei 490 nm. PfCRT-GFPΔM1-His₁₀ verhielt sich in der SEC ähnlich wie in der SDS-PAGE und passierte die Säule in mindestens zwei Formen. Bei 280 nm wurden bei 8,4 ml (Peak 1) und bei 9,8 ml (Peak 2) zwei nicht vollständig getrennte Peaks detektiert, wobei Peak 2 noch eine Schulter bei 11,8 ml aufwies. Der Anteil des Fusionsproteins mit

ausgebildetem GFP-Chromophor zeigte sich als bei 490 nm detektierter, breiter Peak **3** mit beidseitigen Schultern. Dessen Peakmaximum lag wie bei Peak **2** bei 9,8 ml (Abb. 4.9, B). Peak **2** und Peak **3** repräsentieren den vermutlich richtig gefalteten Anteil des GFP-Fusionsproteins, da das GFP-Chromophor, welches sich erst nach korrekter Faltung ausbildet, bei 490 nm erfasst wurde.

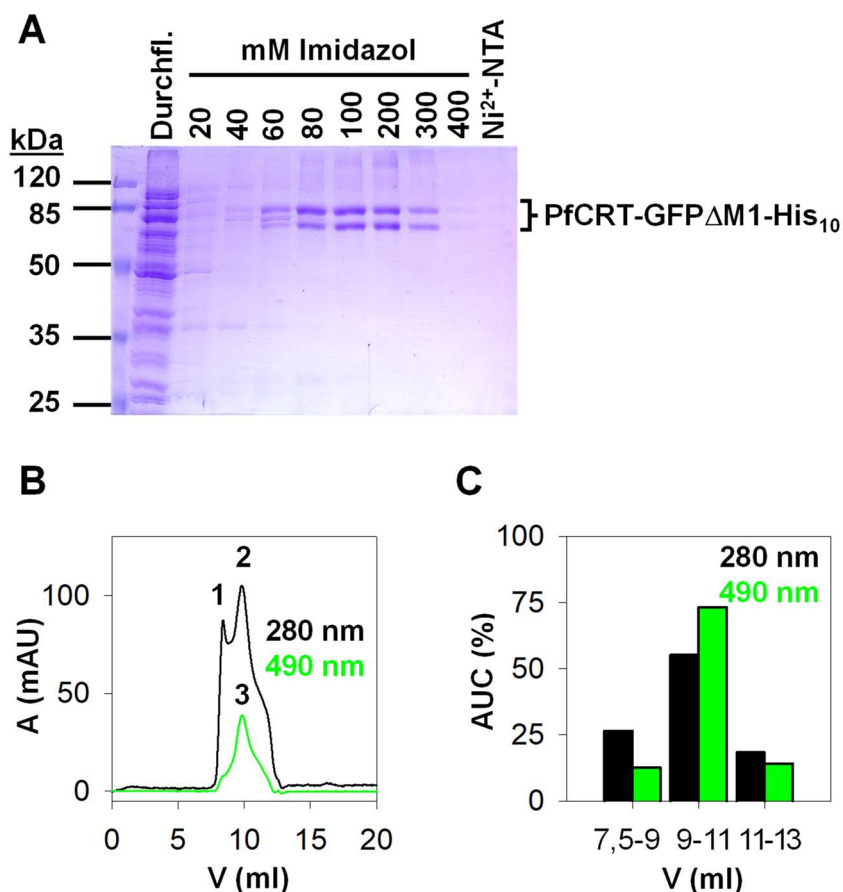


Abb. 4.9 IMAC und SEC von PfCRT-GFP Δ M1-His₁₀ in 0,05 % Brij® 78. (A) Coomassie®-Brillant-Blau gefärbtes SDS-PAGE-Gel der Fraktionen der IMAC an Ni²⁺-NTA. Die für GFP-Fusionsproteine charakteristische Doppelbande ist markiert. (B) SEC-Chromatogramm von PfCRT-GFP Δ M1-His₁₀ bei der Detektion des Gesamtproteins bei $\lambda = 280$ nm (Peak **1** und **2**) und des GFP-Chromophors bei $\lambda = 490$ nm (Peak **3**). (C) Prozentualer Anteil der mit der Trapezmethode berechneten Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) an der Gesamtfläche von Peak **1** und **2** (280 nm) bzw. von Peak **3** (490 nm). Für die IMAC und die SEC wurde ein TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4) mit Zusatz von 500 mM NaCl verwendet.

Da Peak **1** nach dem Totvolumen der Säule (8,0 ml; Holm-Bertelsen, 2016) eluierte, stellt dieser kein hochmolekulares Aggregat dar, sondern das vermutlich fehlgefaltete Protein. Dieses passierte mit einer scheinbaren größeren Masse die Säule. Sein Anteil am Gesamtprotein, ausgedrückt als Fläche unter der Kurve (AUC, *area under the curve*), betrug 27 % (Abb. 4.9, C). Diese Zahl stellt eine Näherung dar, da die Trennleistung keine Basislinientrennung ermöglichte.

Die Schulter von Peak **3**, die mit Peak **1** überlappte, könnte ein in geringem Mengen (13 %; Abb. 4.9, B) vorkommendes Oligomer von PfCRT-GFP Δ M1-His₁₀ darstellen. Ein schwach fluoreszierendes, mögliches Dimer wurde bereits zuvor beobachtet (Vgl. Abb. 4.2). Zusammenfasst, wurde für PfCRT als GFP-Fusionsprotein, wie in der SDS-PAGE, ein duales Migrationsverhalten in der SEC beobachtet. Die Fraktionierung der Probe bei Passage der Säule bietet im Unterschied zur SDS-PAGE die Möglichkeit, die gewünschte Faltungsform anzureichern. Außerdem zeigt das Chromatogramm, dass der Anteil des Proteins mit geringerer Qualität zuerst eluierte.

SEC von PfCRT solubilisiert in Brij® 78, LMNG, DDM und FCH-12

Zellfrei produziertes PfCRT-His₁₀ ohne GFP-Fusion (3.3.2) wurde mit den in Abschnitt 4.1.3 als geeignet identifizierten Detergenzien einer IMAC (3.3.3) unterzogen. Nach einer Konzentrierung der Elutionsfraktionen mit einem Zentrifugierfilter (100k MWCO) (3.3.4) wurde eine SEC (3.3.5) durchgeführt. Da unterschiedliche Proteinmengen injiziert wurden, ergaben sich unterschiedliche Signalhöhen bei Detektion der Absorption bei 280 nm. Das Elutionsvolumen sowie die Basispeakbreite wurden für eine Beurteilung herangezogen. Kein Chromatogramm zeigte einen monodispersen Peak (Abb. 4.10).

Das breiteste Absorptionssignal bei 280 nm wurde mit DDM über etwa 7,5 ml (7,4-14,9 ml) detektiert. Außerdem eluierte ein Aggregatpeak mit einem Maximum bei 8,0 ml, welches dem Totvolumen der Säule entspricht (Abb. 4.10, C). Mit FCH-12, LMNG und Brij® 78 wurde dieser nicht detektiert. Mit FCH-12 wurde ebenfalls ein breites Signal erhalten, welches sich über etwa 6,9 ml (7,9-14,8 ml) erstreckte (Abb. 4.10, D, schwarze Linie). Mit LMNG wurden Signale über 3,3 ml (9,4-12,7 ml) mit Brij® 78 über 4,6 ml (7,9-12,5 ml) detektiert (Abb. 4.10, A und B). Die Chromatogramme lassen vermuten, dass PfCRT in verschiedenen multimeren Formen die Säule passierte. Ein Elutionsvolumen von 8,5-14,5 ml entspricht Molekulargewichten von 562-67 kDa (Holm-Bertelsen, 2016). Diese Korrelation gilt jedoch nur für globuläre Proteine wie BSA. Ein Vergleich mit Proteinstandards führt zu einer Überschätzung des Molekulargewichts von MPs, da diese als Protein-Detergens-Komplex die Säule passieren (Kunji *et al.*, 2008). Innerhalb einer homologen Reihe eines Detergensklasse korrelieren die Stokes-Radien der freien Detergenzien mit denen des Protein-Detergens-Komplexes (Kunji *et al.*, 2008). Ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Detergensklassen gestaltet sich schwieriger, da es kontroverse Ergebnisse zum Umfang des Detergensgürtels um die hydrophoben MP-Bereiche gibt (Chaptal *et al.*, 2017). Folglich wurden ausgewählte SEC-Fractionen mittels SDS-PAGE analysiert, um über einen Vergleich mit dem Größenmarker unterschiedliche Proteinformen zu erkennen. Ein Coomassie®-Brillant-Blau gefärbtes SDS-PAGE-Gel einer FCH-12-Chromatographie zeigt repräsentativ, dass dasselbe SDS-resistente Multimer über die Peakbreite detektiert wurde (Abb. 4.10, E). Dabei spiegeln die Intensitäten der Coomassie®-

Brillant-Blau gefärbten Proteinbanden das Chromatogramm der SEC in Abb. 4.10, D (schwarze Linie), wider.

Um schmale Peaks zu erhalten, wurden nach Herstellerempfehlung maximal 2 % des Säulenvolumens aufgetragen. Die Flussrate konnte aufgrund des tolerierten Drucks nicht erhöht werden, um einer möglichen Peakverbreiterung durch Diffusion entgegen zu wirken. Daher wurde das Säulenmaterial gewechselt. Ein Wechsel von *Superdex*TM 200 (Partikelgröße $\approx 13 \mu\text{m}$; M_r 10-600 Da) auf *Superose*TM 6 *Increase* (Partikelgröße $\approx 8,6 \mu\text{m}$; M_r 5-5.000 kDa) führte am Beispiel des PfCRT-FCH-12-Komplexes zu einem etwa 1 ml schmalen Signal mit jedoch weiterhin unvollständig getrennten Peaks (Abb. 4.10, D, blaue Linie).

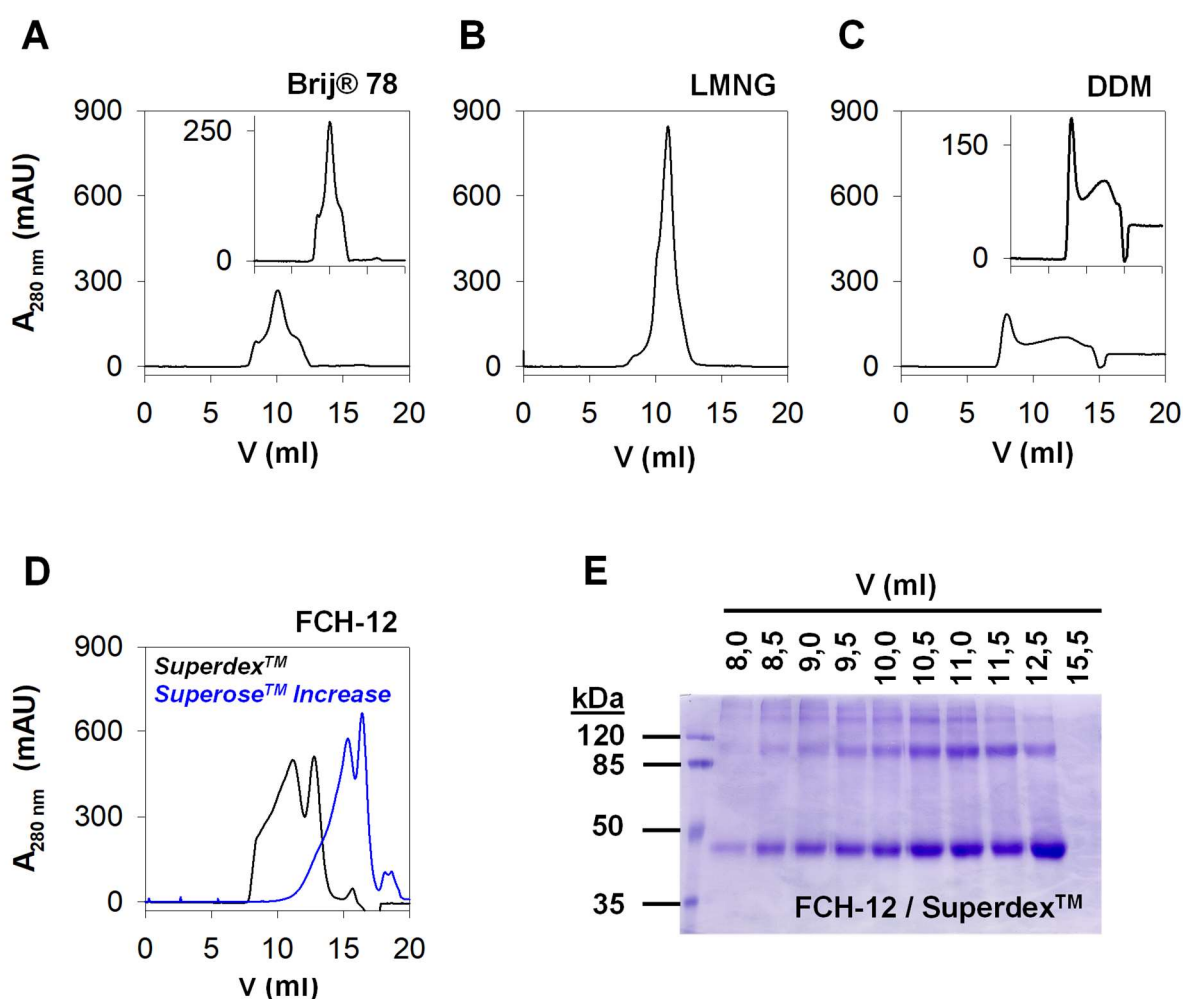


Abb. 4.10 Größenausschlusschromatographie (SEC) von PfCRT-His₁₀ als Komplex mit verschiedenen Detergenzien. Der TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4) enthielt zusätzlich in (A) 500 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,05 % Brij® 78, in (B) 500 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,005 % LMNG, in (C) 300 mM NaCl, 5 % Glycerol, 0,05 % DDM und in (D) 500 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,2 % FCH-12. Das Eluat wurde zu je 500 μl fraktioniert. (E) Ausgewählte Elutionsfraktionen aus (D) wurden mittels SDS-PAGE getrennt (12 μl pro *lane*) und mit Coomassie®-Brillant-Blau gefärbt.

Zu unterschiedlich Anteilen zusammengesetzte Protein-Detergens-Komplexe bieten eine Erklärung für die breiten Peaks und die fehlende Monodispersität bei anscheinend gleichem Verhalten des Proteins in der SDS-PAGE. Die schmalere und etwas symmetrischere Peaks mit Brij® 78 und LMNG ließen eine homogenere Probe als mit FCH-12 und DDM vermuten.

Stabilität von solubilisiertem PfCRT

DDM und LMNG übten nur einen befristeten solubilisierenden und stabilisierenden Effekt auf PfCRT-His₁₀ aus. Es wurden Präzipitate beim Konzentrierungsprozess oder nach kurzer Lagerung in konzentrierten Proteinproben beobachtet. Dies ist ein bei MPs häufig auftretendes Problem (Gräslund *et al.*, 2008). Für LMNG und Brij® 78 wurde die Langzeitstabilität von PfCRT-His₁₀ durch erneute Größenausschlusschromatographie (3.3.5) nach Lagerung untersucht. Die zentralen Elutionsfraktionen der Peakmaxima (Abb. 4.11, rot gestrichelte Linien) wurden vereinigt, für sieben Tage bei 4 °C gelagert und dann erneut mittels SEC analysiert (Abb. 4.11, schwarze Linien). Die LMNG-Probe zeigte einen Peak, dessen Lage im Vergleich zum vorherigen Peak zu größeren Elutionsvolumina verschoben war (Abb. 4.11, B). Dies deutet eine Verkleinerung des hydrodynamischen Durchmessers durch eine mögliche Zersetzung der Probe an. Zugleich indiziert die geringere Signalhöhe nicht nur einen Probenverlust durch Aufbereitung, sondern auch die beschriebene Präzipitation. Präzipitate wurden durch eine Zentrifugation vor dem Probenaufrag abgetrennt, um eine Verstopfung des Chromatographiesystems zu verhindern. Eine Reinjektion des zentralen Peaks des in Brij® 78 solubilisierten PfCRTs zeigte nach siebentägiger Lagerung keine Veränderung der Peakform und -lage (Abb. 4.11, A). Brij® 78 übte folglich einen stabilisierenden Effekt auf PfCRT aus.

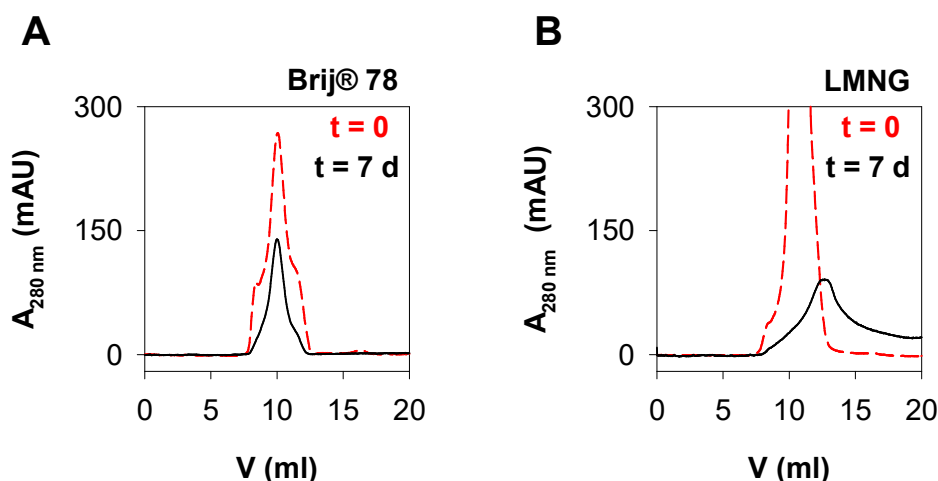


Abb. 4.11 Stabilität von PfCRT-His₁₀ in Brij® 78 und LMNG. Nach SEC von PfCRT-His₁₀ solubilisiert in (A) 0,05 % Brij® 78 und (B) 0,005 % LMNG wurden die Fraktionen des zentralen Peaks (rot gestrichelte Linie) vereinigt und jeweils für sieben Tage bei 4 °C gelagert. Eine Veränderung der Peakform und -lage nach Reinjektion (schwarze Linie) gibt Hinweise auf die Stabilität des Proteins in dem verwendeten Detergens. Puffer: 20 mM TRIS (pH 7,4), 500 mM NaCl, 2 mM DTT.

4.1.5 Untersuchungen zu SDS-resistenten Multimeren von zellfreiem PfCRT

Unter denaturierenden Bedingungen migrierte zellfreies PfCRT im SDS-PAGE-Gel in mehreren scheinbaren Molekulargewichten. Als GFP-Fusionsprotein ließen sich im Gel zwei fluoreszierende Banden entsprechend eines Monomers und eines Dimers detektieren (Abb. 4.2, B). Ohne GFP wurden drei bis vier Banden in Western Blots bzw. *Coomassie*®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gelen beobachtet, und zwar unabhängig von dem verwendeten Detergens (siehe Abschnitt 4.1.3).

Einfluss der Probenvorbereitung auf die SDS-PAGE von PfCRT

Nach der IMAC mit DDM wurden Aliquots von zellfreiem PfCRT in Vorbereitung auf die SDS-PAGE mit dem SDS-Ladepuffer (4x) versetzt. Dauer und Temperatur der Inkubation wurden für die verschiedenen Ansätze variiert. Anschließend wurden alle Proben elektrophoretisch getrennt und das Trenngel wurde mit *Coomassie*®-Brillant-Blau gefärbt (Abb. 4.12). Die bei Raumtemperatur und bei 37 °C inkubierten Proben zeigten eine Proteinleiter aus mindestens vier erkennbaren Einzelbanden. Unter weniger milden Bedingungen bei 60 °C und 95 °C nahm die Intensität der weiter ins Gel migrierenden Banden ab und eine Bande an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel markierte eine Aggregation. Für die höchste Inkubationstemperatur war dies zu erwarten, da MPs im Vergleich zu löslichen Proteinen bei der denaturierenden Probenvorbereitung unter Hitzeeinwirkung aggregieren (Sagné *et al.*, 1996). Zur SDS-Resistenz ließ sich also auch eine partielle Temperatur-Resistenz feststellen.

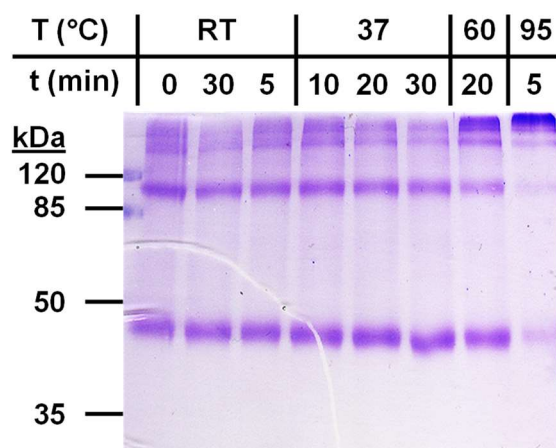


Abb. 4.12 SDS-resistente, multimere PfCRT-Banden werden nur wenig von der Inkubationstemperatur und -zeit mit denaturierendem SDS beeinflusst. Die Tabelle über dem *Coomassie*®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gel zeigt die Inkubationsbedingungen an, unter denen in DDM solubilisiertes PfCRT in Vorbereitung auf die SDS-PAGE mit SDS-Ladepuffer behandelt wurde.

Trennung von PfCRT durch einen 100k-MWCO-Filter

Affinitätsgereinigtes PfCRT im TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4), versetzt mit 500 mM NaCl und 0,05 % DDM, wurde durch einen Filter mit einem *molecular weight cut-off* (MWCO) von 100 kDa (3.3.4) zentrifugiert (5.000 g). Nachdem 60 % der Probe den Filter passierten, wurde die Zentrifugation beendet. Der Überstand und der Durchfluss wurden mittels SDS-PAGE und nachfolgender *Coomassie*®-Brillant-Blau-Färbung analysiert (3.2.2). Die unterschiedlichen Volumina der Proben wurden für eine Vergleichbarkeit berücksichtigt. Abb. 4.13, A, steht repräsentativ für zwei Experimente, in denen zellfreies PfCRT mehrheitlich im Filterüberstand als Proteinleiter detektiert wurde. Dies indiziert eine Größe des Protein-Detergens-Komplexes von mehr als 100 kDa. Da Moleküle nahe des Ausschlussgewichts des Filters nicht vollständig zurückgehalten werden, bietet dies eine Erklärung für die schwachen Signale im Filterdurchfluss. Für eine genauere Größenbestimmung wurde ähnlich aufbereitetes PfCRT-His₁₀ aus dem Überstand eines 100-kDa-Filters in einem 10%igen Trenngel im Vergleich zu zwei Größenmarkern analysiert (Abb. 4.13, B). Es migrierte in Vielfachen von 45 kDa. Ein Anti-Penta-His-Antikörper erkannte neben der bereits zuvor beobachteten Dimer-Bande eine dritte, höhermolekulare Bande. Die Proteinmarker unterschiedlicher Hersteller indizierten für diese unterschiedlichen Molekulargewichte (138 kDa bzw. 200 kDa).

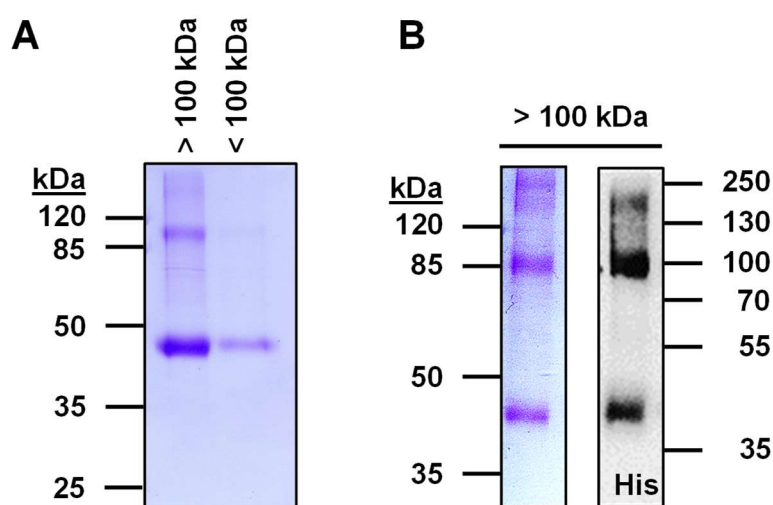


Abb. 4.13 Passage von in DDM solubilisiertem PfCRT-His₁₀ durch einen Zentrifugierfilter (100k MWCO). (A) Im *Coomassie*®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gel (12,5 %) wurde PfCRT-His₁₀ mehrheitlich im Überstand des Filters detektiert, d.h. mit einem Molekulargewicht des Protein-Detergens-Komplexes von > 100 kDa. (B) Für eine genauere Größenbestimmung wurde ähnlich behandeltes PfCRT-His₁₀ im Vergleich mit zwei verschiedenen Proteinmarkern in einem 10%igen SDS-PAGE-Gel getrennt. Eine Detektion erfolgte zusätzlich immunologisch über einen Anti-Penta-His-Primärantikörper (Belichtung: 4 s, *Lumi Imager*TM F1).

Punktmutation des postulierten Dimerisierungsmotivs von PfCRT

Martin und Kirk (2004) identifizierten in ihrer bioinformatischen Analyse ein Glycin enthaltendes *helix packing motif* in der fünften und zehnten postulierten TM des PfCRT (GXXXXXXT). Dieses soll eine interhelikale Packung und somit die Bildung von Oligomeren ermöglichen. Der Glycinrest an Position 186 in der fünften TM wurde durch ortsspezifische Mutagenese gegen zwei raumfüllendere Aminosäuren, Leucin und Phenylalanin, ausgetauscht. Zunächst wurde *opt_pfcrt* aus dem pET-3a-Vektor in den *high-copy*-Hefevektor pDRTXa subkloniert durch Restriktionsverdau (3.1.4), Isolierung der elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel (3.1.5), Ligation (3.1.6) und Transformation von kompetenten DH5α *E. coli* (3.1.1). Der pDRTXa-Vektor erleichterte die nachfolgende molekularbiologische Arbeit, da mit einer Minipräparation (3.1.3) etwa drei- bis viermal höhere Plasmid-Konzentrationen im Vergleich zum pET-3a-Vektor erreicht wurden. Die erfolgreiche Subklonierung über die Schnittstellen *Spe* I und *Xho* I wurde durch elektrophoretische Trennung der spezifischen DNA-Fragmente in einem einprozentigen Agarosegel verifiziert (Abb. 4.14).

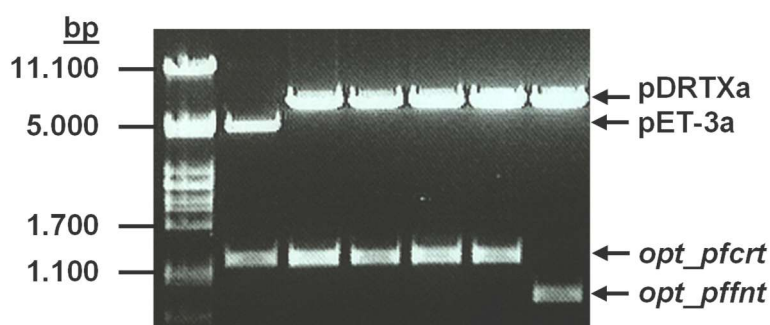


Abb. 4.14 Verifikation der Subklonierung von *opt_pfcrt* in den Vektor pDRTXa. Die elektrophoretische Trennung der mit den Restriktionsendonukleasen *Spe* I und *Xho* I generierten linearen DNA-Fragmente in einem einprozentigen Agarosegel bestätigt die erfolgreiche Subklonierung. An die Position der codonoptimierten Sequenz für den plasmodialen Formiat-Nitrit-Transporter (*opt_pffnt*; Bock, 2014) wurde *opt_pfcrt* eingefügt. Neben den Fragmenten aus den zu kontrollierenden Plasmiden sind die der Ursprungsplasmide gezeigt.

Das generierte Plasmid diente im Anschluss als *template* für die ortsspezifische Mutagenese-PCR (3.1.7). Die verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.1 aufgeführt. Aus Kolonien von *E. coli*, die nach Transformation (3.1.1) mit dem Mutagenese-PCR-Produkt gewachsen sind, wurde die Plasmid-DNA isoliert (3.1.3). Die mittels Sanger-Sequenzierung (3.1.8) bestätigte mutierte DNA-Sequenz wurde wieder über die Schnittstellen *Spe* I und *Xho* I in den pET-3a-Vektor subkloniert. Aufgrund einer technischen Störung der integrierten Kamera wurde die erfolgreiche Subklonierung visuell ohne photographische Dokumentation bestätigt.

PfCRT, PfCRT-G186L und PfCRT-G186F wurden jeweils in Doppelbestimmung in einem analytischen Maßstab zellfrei produziert (3.3.2). Über ihre C-terminalen His₁₀-tags wurden die Zielproteine an Ni²⁺-NTA, wie zuvor in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, in einem verkürzten IMAC-Verfahren gereinigt. Die Zielproteine wurden mit 160 µl des 400 mM Imidazol enthaltenden TRIS-Puffers (20 mM, pH 7,4) eluiert. Der TRIS-Puffer enthielt 500 mM NaCl und 0,05 % Brij® 78. Da die beobachtete Proteinleiter unabhängig vom Detergens war, wurde das Detergens der CF-Produktion auch für die IMAC verwendet. Von den Elutionsfraktion wurden 24 µl in der nachfolgenden SDS-PAGE analysiert (3.2.2). Über einen Anti-Penta-His-Primärantikörper wurde für alle Proben jeweils eine Monomer-Bande als auch eine etwas schwächere, dennoch markante Dimer-Bande detektiert (Abb. 4.15). Die Substitution des Glycins in der fünften TM hatte keinen Einfluss auf die bereits zuvor beobachteten SDS-resistenten Dimere. Eine zusätzliche Mutation des Glycins in der zehnten TM (G387) wurde nicht untersucht.

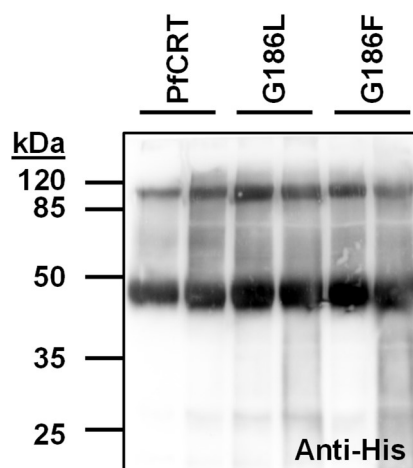


Abb. 4.15 Mutation der Glycine im von Martin und Kirk (2004) postuliertem Dimerisierungsmotiv von PfCRT. Gezeigt sind affinitätsgereinigtes zellfreies PfCRT-His₁₀ sowie die G186L- und G186F-Mutanten, detektiert unter Verwendung eines Anti-Penta-His-Primärantikörpers (Belichtung: 7 s; ChemoStar ECL & Fluorescence Imager).

4.1.6 Versuche zur Strukturaufklärung von zellfreiem PfCRT

Kristallisationsversuche

Das *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) wurde beauftragt, Kristallisations-screens mit den kommerziell verfügbaren Kits *MemGold2TM* und *Membrane HTS96TM* durchzuführen. Diese Kits basieren auf dem *sitting-drop*-Verfahren. Bei diesem soll eine konzentrierte Proteinlösung durch den Zusatz von Präzipitantien und den Austausch des Lösungsmittels über den Dampfraum des Kristallisationspuffers in einen übersättigten Zustand überführt werden (McPherson & Gavira, 2014). Solubilisiertes Protein wurde im Verhältnis 1:1 mit dem jeweiligen Kristallisationstestpuffer zu einem Gesamtvolumen von 2 nl versetzt und bei 19 °C gelagert. Über mehrere Wochen wurde durch Mitarbeiterinnen am EMBL die

Veränderung der Tropfen dokumentiert. Durch die mikroskopischen Aufnahmen konnte auf die Entstehung von Kristallen geprüft werden. Zur Solubilisierung von zellfreiem PfCRT-His₁₀ (9-12 mg ml⁻¹) wurden zunächst die klassischen Kristallisationsdetergenzien DDM und FCH-12 ausgewählt. In einem Puffer aus 20 mM TRIS (pH 7,4), 500 mM NaCl und im Fall von FCH-12 zugesetzt mit 2 mM DTT wurde solubilisiertes PfCRT auf eine Kristallisation getestet. Mit DDM wurde aufgrund von Stabilitätsproblemen die Konzentration auf 0,25 % Detergens erhöht. Sowohl mit DDM als auch mit FCH-12 (0,2 %) wurde kein Proteinkristall erhalten. Vereinzelt aufgetretene Kristalle zeigten keine Fluoreszenz unter UV-Licht. Da PfCRT Tryptophane enthält, ist dies ein Ausschlusskriterium für die Anwesenheit von Protein in den Kristallen. Darüber hinaus wurden klare Tropfen, Phasenseparationen oder bräunliche Schlieren, welche eine Denaturierung andeuten, beobachtet. Wie die Chromatogramme der SEC und auch dieses Ergebnis andeuteten, war die Heterogenität der Proteinprobe noch zu hoch. Im Gegensatz zur Kristallisation für eine röntgendiffraktometrische Strukturaufklärung lässt die Kryo-EM ein gewisses Maß an Proben-Heterogenität zu (Cheng, 2015). Zur Erfassung der Qualität des zellfreien PfCRT-His₁₀ wurde dieses solubilisiert in verschiedenen Detergenzien zunächst mittels negativ kontrastierter Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht.

Transmissionselektronenmikroskopie

TEM-Aufnahmen können über Partikelgröße und -form auch Auskunft über den Oligomerisierungszustand geben (Hajek *et al.*, 2019). Die Auflösung ist dabei meist auf 20 Å begrenzt (Kiselev *et al.*, 1990). Die Homogenität der Probe wird mit dieser Methode besser erfasst als mittels SDS-PAGE und SEC, weshalb sie auch für eine Probenoptimierung in Vorbereitung auf eine Kryo-EM genutzt wird (Cheng *et al.*, 2015). Die Negativkontrastierung der Proteinproben und die Mikroskopie am Anatomischen Institut der CAU in Kiel wurde von P. Arnold durchgeführt. In Anlehnung an Arnold *et al.* (2014) wurden die Proben von ihm auf ein mit einem Kohlefilm überzogenes Kupfergitter aufgetragen und anschließend mit einer Uranylacetat-Lösung benetzt. Die Metallatome legen sich als elektronendichte Matrix um die zu mikroskopierenden Partikel (Kiselev *et al.*, 1990). Dadurch erscheinen biologische Proben wie Proteine, aber auch manche Detergenzien als helle Gebilde auf dunklem Untergrund. Die Komponenten des Puffers nehmen Einfluss auf die Kontrastierung und Qualität der TEM-Aufnahmen (Gewering *et al.*, 2018). In FCH-12 solubilisiertes PfCRT wurde nicht mikroskopiert. Mit LMNG wurden aufgrund der geringen Stabilität heterogene Proben erhalten, die zudem einen hohen Hintergrund durch leere Mizellen aufwiesen. Analysierbare Aufnahmen wurden von PfCRT-His₁₀ solubilisiert in 0,05 % DDM erhalten. Proteinproben wurden zuvor mittels IMAC (3.3.3) und teilweise auch mittels SEC (3.3.5) gereinigt. Leere DDM-Mizellen zeigten sich als weiße, rundliche Partikel. Im Unterschied dazu markierten Proteinpartikel eine strukturiere Form. Eine zentrale Verdunklung deutete eine Pore an.

Eine Größenbestimmung von zehn willkürlich ausgewählten Partikeln ergab einen Durchmesser von $(6,1 \pm 0,4)$ nm (Arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung) (Abb. 4.16, A). Einzelne Partikel sind exemplarisch in zehnfacher Vergrößerung gezeigt (Abb. 4.16, B). Die geringe Stabilität in DDM äußerte sich in einer heterogenen Probe. Klassensummen, die von P. Arnold von einer anderen PfCRT-Probe berechnet wurden (Abb. 4.16, C), zeigen unterschiedliche Partikelgrößen und -formen. Noch vor der Mikroskopie dieser Probe präzipitierte PfCRT-His₁₀ nach dem Konzentrieren mit einem Zentrifugierfilter (100k MWCO).

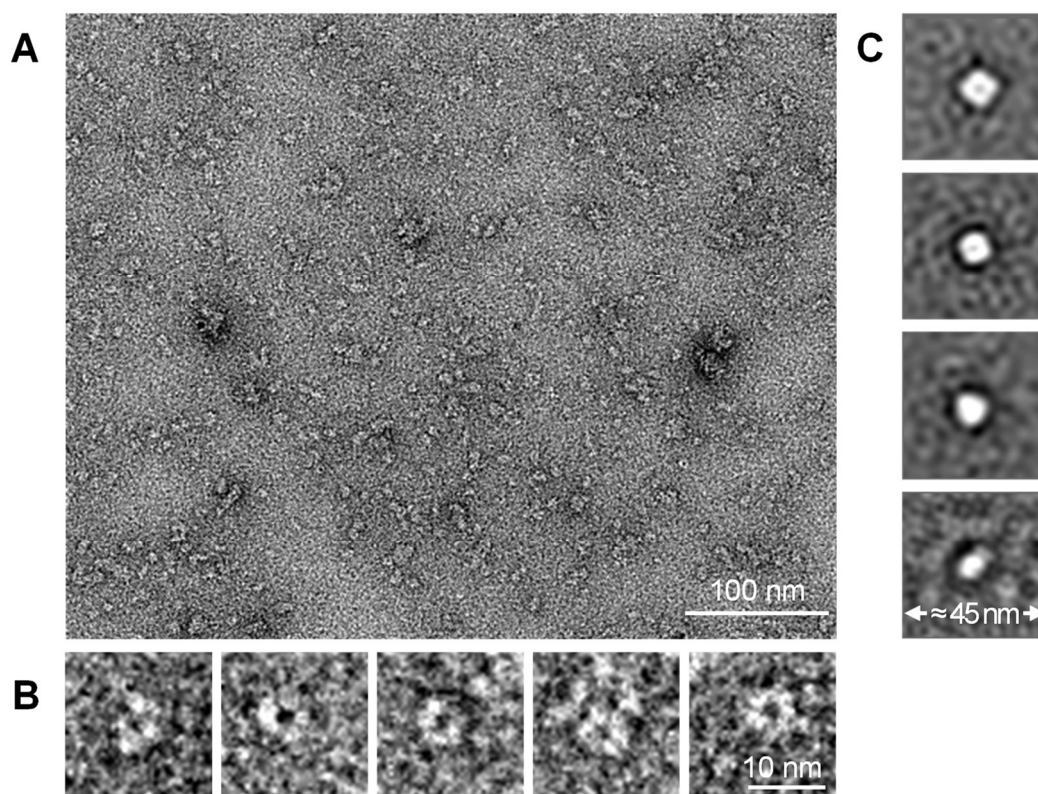


Abb. 4.16 Transmissionselektronenmikroskopie von PfCRT-His₁₀ solubilisiert in 0,05 % DDM. Die Negativkontrastierung von Uranylacetat sowie die Mikroskopie wurden von P. Arnold (Anatomisches Institut, CAU, Kiel) durchgeführt. Affinitätsgereinigtes PfCRT-His₁₀ (20 mM TRIS (pH 7,4), 500 mM NaCl) in der Übersicht (A) und in Vergrößerung (B). (C) Klassensummen aus etwa 2500 Einzelpartikel von PfCRT (20 mM TRIS (pH 7,4), 300 mM NaCl, 5 % Glycerol) nach IMAC und SEC. Vor der Mikroskopie wurden Präzipitate in der Probe beobachtet.

In Kooperation mit A. Möller und J. Dovile wurde in Brij® 78 solubilisiertes PfCRT-His₁₀ am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt mikroskopiert und analysiert. Die zentralen Peakfraktionen von zellfreiem PfCRT-His₁₀ (Elutionsvolumen: 9,5-10,5 ml) wurden nach der SEC (3.3.5) vereinigt und auf Eis transportiert. In Frankfurt wurde die Probe konzentriert (50k MWCO) und erneut chromatographisch über ein ÄKTA-System getrennt. Dabei wurde ein annähernd monodisperser Peak erhalten (Abb. 4.17, A). Die zentrale Fraktion (0,46 mg ml⁻¹) wurde von A. Möller als negativkontrastierte Probe mikroskopiert und zu Klassensummen verrechnet. Eine längliche Form, die eine dunkle Einkerbung zeigt, indiziert eine Dimerisierung

(Abb. 4.17, B). Die Homodimere waren repräsentativ für etwa 50 % der analysierten Partikel (Persönliche Mitteilung von A. Möller). Die Monomere ähneln zudem in ihrer Form den in DDM solubilisierten PfCRT-His₁₀-Partikeln, die keine Degradation zeigten.

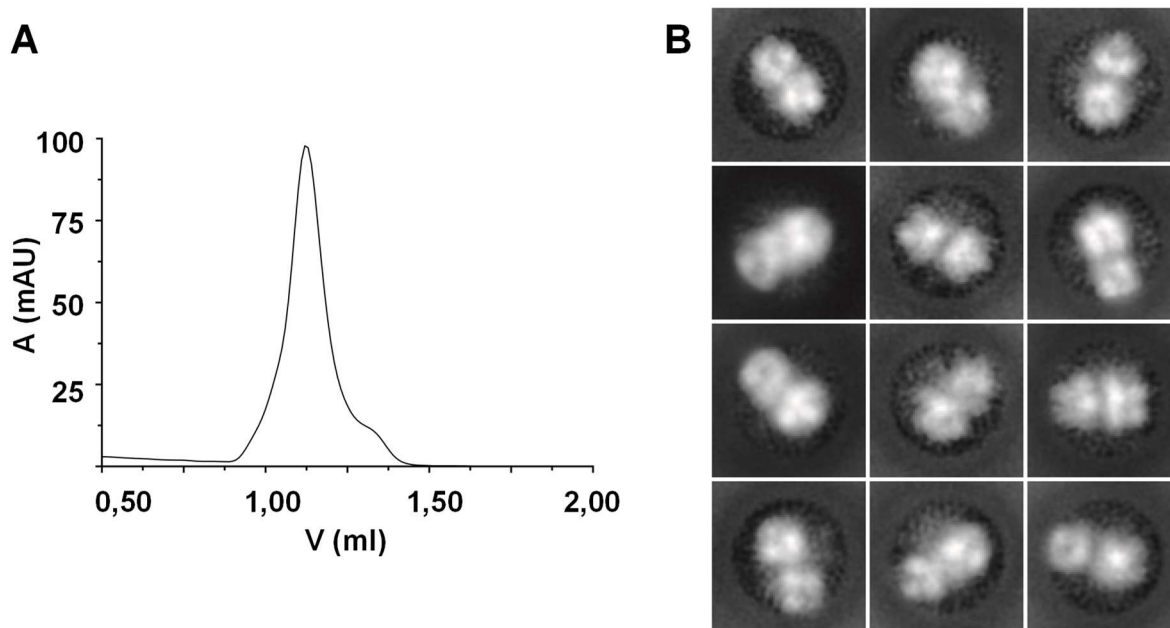


Abb. 4.17 Größenausschusschromatographie und Transmissionselektronenmikroskopie von PfCRT-His₁₀ solubilisiert in 0,05 % Brij® 78. (A) PfCRT-His₁₀ (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,4) wurde zweifach mittels SEC gereinigt. Bei der zweiten SEC (A), bei der die zentralen Peakfraktionen injiziert wurden, wurde ein annähernd monodisperser Peak erhalten. (B) Negativkontrastierte TEM-Aufnahmen von der zentralen Peakfraktion der zweiten SEC zeigen Homodimere von PfCRT-His₁₀, welche repräsentativ für ca. die Hälfte der Partikel in dieser Peakfraktion waren. Probenvorbereitung, -mikroskopie und Partikelanalyse wurde von A. Möller mit Unterstützung von J. Dovile am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt durchgeführt.

Zusammenfassend indizieren die Chromatogramme der SEC und die TEM-Aufnahmen eine höhere Homogenität der Brij® 78 enthaltenden PfCRT-Proben im Vergleich zur Solubilisation mit anderen Detergenzien. Darüber hinaus wurde eine Stabilisierung durch Brij® 78 über mehrere Tage nachgewiesen. Ein weiteres Stabilitätsmerkmal sind die beobachteten Dimere in TEM-Aufnahmen, welche zeigen, dass Brij® 78 eine Interaktion der Monomereinheiten zu einem Dimer zuließ und nicht behinderte. Damit wurde Brij® 78 nicht nur als geeignetes Detergens für eine zellfreie Produktion, sondern für den gesamten Prozess der Reinigung von PfCRT evaluiert und als aussichtsreiches Detergens für eine zukünftige Elektronenmikroskopie von PfCRT identifiziert.

4.2 Ein phänotypischer Assay zur Findung eines PfCRT-Inhibitors

Neben der zuvor vorgestellten Produktion, um PfCRT einer Strukturaufklärung zugänglich zu machen, welche die Grundlage für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign bieten könnte, wurde parallel ein zweiter Ansatz zur Findung eines PfCRT-Inhibitors verfolgt.

Das Wachstumsverhalten von PfCRT exprimierenden *S. cerevisiae* in Anwesenheit von CQ wurde für das Screening einer Substanzbibliothek nach einem Inhibitor genutzt. In Vorbereitung auf eine Phänotypisierung wurde durch gezielte Einführung von acht Mutationen die Dd2-Isoform, welche mit einer CQ-Resistenz assoziiert wird, aus der Wildtypsequenz von PfCRT^{3D7} generiert.

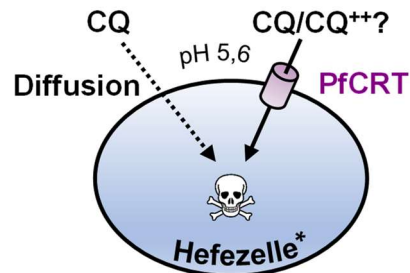
4.2.1 Mutagenese von PfCRT^{3D7} zu PfCRT^{Dd2}

Durch sukzessive Mutagenese wurde aus dem für PfCRT^{3D7} kodierenden Genabschnitt der für PfCRT^{Dd2} aufgebaut. Als *template* für die ortsspezifische Mutagenese-PCR (3.1.7) diente *opt_pfcrt* im pDRTXa-Vektor (siehe 4.1.5). Sequenzierte Plasmid-DNA wurde als *template* für nachfolgende Mutagenese-PCRs verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.1 gelistet. Als erste Mutation wurde der nahezu universell in CQ resistenten Parasiten vorkommende Austausch an Position 76 von Lysin (K) gegen Threonin (T) (Fidock *et al.*, 2000; Lakshmanan *et al.*, 2005) in *opt_pfcrt* auf DNA-Ebene realisiert. Beim Einführen der A220S-Mutation trat auch eine unerwünschte Mutation auf, die für einen Austausch von Glycin an Position 113 gegen Asparagin (G113N) kodierte. Diese unerwünschte Mutation wurde zunächst beibehalten und nach Einführen der benachbarten Mutationen N74I und M75E wieder zurückmutiert. Schließlich wurden nacheinander weitere PCRs durchgeführt, die die folgenden Aminosäureaustausche auf Proteinebene bewirkten: Q271E, R371I, N326S und I356T.

4.2.2 Phänotypische Charakterisierung von PfCRT-Isoformen in *S. cerevisiae*

In der Plasmamembran von *S. cerevisiae* wird für PfCRT eine ähnliche Topologie angenommen wie in *X. laevis* Oozyten, nämlich mit zytosolischen Termini (Baro *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2009). Ein Influx von CQ aus dem umgebenden Medium in das Zytosol der Hefezellen entspräche damit einem Efflux aus der parasitären Verdauungsvakuole in das parasitäre Zytosol. PfCRT vermittelt in einer von der CQ-Konzentration abhängigen Weise über einen CQ-Influx ein Wachstumsdefizit von *S. cerevisiae* (Baro *et al.*, 2011; Baro *et al.*, 2013). Diese Beeinträchtigung des Hefewachstums durch induktive PfCRT-Expression wurde von Baro *et al.* (2011) und Baro *et al.* (2013) in Koloniebildungsassays auf Agarplatten sowie über die Wachstumsverzögerung gegenüber der nicht induzierten Hefe in Flüssigkultur bestimmt. Diese Wachstumsverzögerung korrelierte linear mit der [³H]-CQ-Aufnahme verschiedener PfCRT-Isoformen in *S. cerevisiae* (Baro *et al.*, 2013). Diese Beobachtung lässt sich für die Entwicklung eines phänotypischen *rescue*-Assay für die Findung eines PfCRT-Inhibitors ausnutzen, welcher eine durch CQ-Influx ausgelöste Wachstumsbeeinträchtigung regenerieren könnte. Die Grundannahme der zytotoxischen Wirkung von CQ auf *S. cerevisiae* wurde durch die phänotypische Charakterisierung von drei PfCRT-Isoformen überprüft (Abb. 4.18). Die für PfCRT kodierenden Gene wurden dabei in dieser Arbeit konstitutiv exprimiert.

Das saure Medium (SD-AHLW, pH 5,6) ahmte die physiologischen Bedingungen in der Verdauungsvakuole von *P. falciparum* nach. Bei einem solch saurem pH liegt CQ ($pK_{s1} = 8,1$; $pK_{s2} = 10,2$; Irvin & Irvin, 1947) mehrheitlich ($> 99,7\%$) nach Henderson-Hasselbalch (Po & Senozan, 2001) zweifach protoniert vor. Ein Übertritt ins Zytosol durch passive Diffusion sollte dadurch minimiert sein, sodass eine PfCRT-spezifische Aufnahme von CQ gemessen werden konnte.



* *S. cerevisiae* W303-1A

Abb. 4.18 Prinzip der phänotypischen Charakterisierung von PfCRT-Isoformen in *S. cerevisiae*. Ein Übertritt des dibasischen CQs aus dem Kulturmedium in das Zytosol der Hefezelle durch passive Diffusion ist aufgrund des sauren pH-Werts minimiert. Es wird eine Topologie mit zytosolischen Termini in *S. cerevisiae* angenommen. Folglich entspricht ein erleichterter CQ-Influx über eine PfCRT-Isoform an der Plasmamembran einem Efflux aus der Verdauungsvakuole in *P. falciparum*. In der Hefezelle wirkt CQ nach unbekanntem Mechanismus wachstumsbeeinträchtigend (Baro *et al.*, 2011; Baro *et al.*, 2013).

Zunächst wurde die Expression von PfCRT^{3D7} in den Membranfraktionen immunologisch überprüft. Transformierte *S. cerevisiae* (3.1.2) vom Stamm W303-1AΔjen1Δady2 wurden mechanisch aufgeschlossen und schrittweise zentrifugiert (3.4.1). In der 100.000-*g*-Fraktion wurde die Expression von PfCRT^{3D7} mit einem gegen den N-terminalen HA-tag gerichteten Primärantikörper in einem Western Blot (3.2.2) nachgewiesen (Abb. 4.19). Mit einer berechneten Masse von HA-PfCRT^{3D7}-FXa-His₁₀ von 52,5 kDa wurde die stärkste Bande auf einer Laufhöhe detektiert, die einer scheinbaren Masse von 46,5 kDa entspricht. Da für Membranproteine ein *gel-shifting*-Verhalten (Rath & Deber, 2013) oft beobachtet wird, könnte diese Bande das vollständig translatierte Protein darstellen. Eine schwächere Bande bei 50 kDa könnte eine anders posttranslational modifizierte (glykosylierte) Variante darstellen. Bei der 46,5-kDa-Bande ist auch ein Abbruch am C-Terminus vorstellbar, da ein Anti-Penta-His-Primärantikörper PfCRT^{3D7} über dessen C-terminalen His₁₀-tag nicht detektierte. Ein Fragment, welches bei 34,3 kDa detektiert wurde, würde bei einem Abbruch im *loop 7* zwischen TM 7 und TM 8 entstehen (Topologie nach Martin und Kirk, 2004). Nachfolgend wurde der Hefestamm W303-1A verwendet, da ein Knockout der endogenen Monocarboxylat-transporter JEN1 und ADY2 (Casal *et al.*, 2016) für die phänotypische Charakterisierung von PfCRT und dessen Varianten nicht benötigt wurde. Die PfCRT-Proteine zeigten sich funktional, konnten aber im Western Blot nicht detektiert werden.

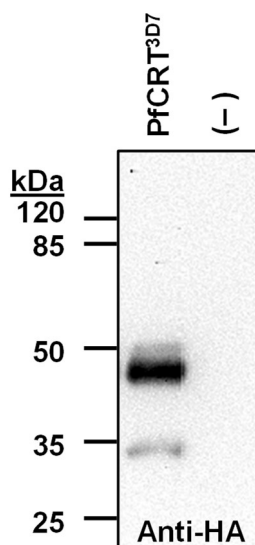


Abb. 4.19 Nachweis von PfCRT^{3D7} in *S. cerevisiae* (W303-1AΔjen1Δady2). Pro lane sind 20-25 µg Gesamtprotein der 100.000-g-Fraktionen aufgetragen. Über den N-terminalen HA-tag wurde PfCRT im Vergleich zu einer mit dem Leerplasmid transformierten Hefe (–) detektiert. Belichtung: 2 min (*Lumi ImagerTM F1*).

Die Vermehrung von *S. cerevisiae* in Anwesenheit von bis zu 50 mM CQ wurde über eine Trübungsmessung in einem 100-well-Plattenformat zeitlich verfolgt (3.4.3). Die AUC der erhaltenen Signalkurve wurde als Maß für das Wachstum der Zellkultur berechnet und diente zur Aufstellung einer Dosis-Wachstums-Beziehung. Diese ergab für alle getesteten Hefen einen sigmoidalen Kurvenverlauf (Abb. 4.20, A-D). Die Leerplasmid-Kontrolle (–) zeigte bei einem Zusatz von 25 mM CQ eine Reduktion der AUC um etwa 20 % ($n = 4$), bei Zusatz von 50 mM CQ zum Medium eine Reduktion um etwa 67 % ($n = 2$) (Abb. 4.20, A). Für Hefen, die PfCRT^{3D7}, PfCRT^{3D7}-K76T oder PfCRT^{Dd2} (4.2.1) exprimierten, wurde in diesem Konzentrationsbereich keine Trübung der Kulturen mehr beobachtet, was sich in einer Reduktion der AUC um 98-99 % ausdrückte. Die Erwartung, dass Hefen, die keinen PfCRT exprimierten, unempfindlicher gegenüber CQ im Medium sind, wurde erfüllt.

Die Links-Verschiebung der Dosis-Wachstums-Kurven der PfCRT exprimierenden Hefen im Vergleich zur Leerplasmid-Kontrolle zeigt einen konzentrationsabhängigen, durch die PfCRT-Isoformen vermittelten CQ-Influx an. Die Beeinträchtigung des Hefewachstums setzte bei PfCRT^{Dd2} exprimierenden Hefen im Vergleich zu den anderen zwei untersuchten PfCRT-Isoformen in geringeren Konzentrationen von CQ im Medium ein. Dies wird am Beispiel einer Konzentration von 3,13 µM CQ im Medium deutlich. Diese reduzierte das Wachstum um 38 % im Vergleich zur Kontrolle bei Expression von PfCRT^{Dd2} ($n = 4$) im Vergleich zu 9 % PfCRT^{3D7} ($n = 4$) beziehungsweise 16 % bei PfCRT^{3D7}-K76T ($n = 2$).

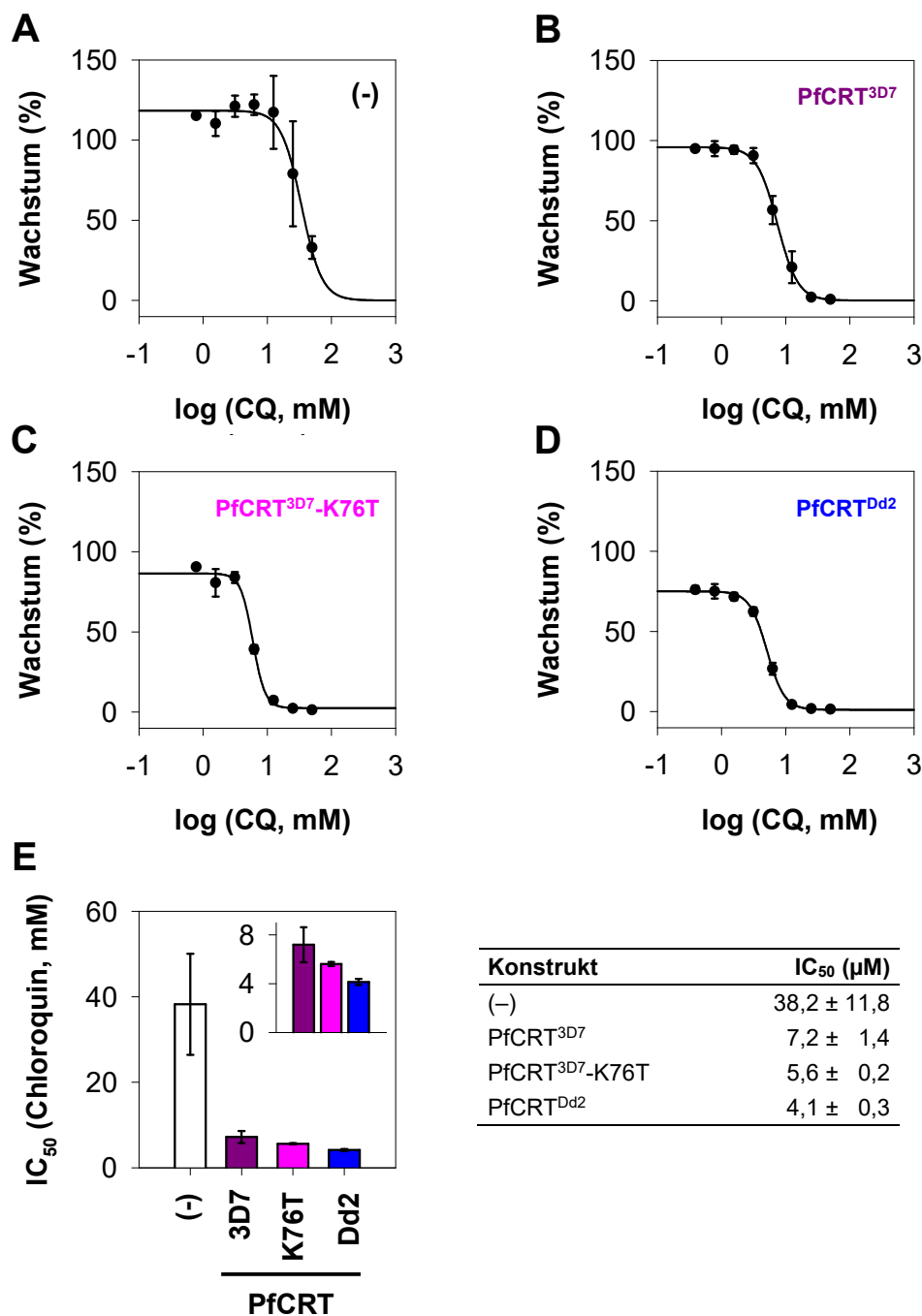


Abb. 4.20 Einfluss von Chloroquin auf das Wachstum von PfCRT-Isoformen exprimierenden *S. cerevisiae* (W303-1A). Hefesuspensionen wurden in Anwesenheit der indizierten Konzentrationen CQ sowie Kontrollen ohne CQ im Medium (SD-AHLW) in 100-*well*-Platten kultiviert ($V = 300 \mu\text{l}$). Als Maß für das Wachstum wurde die AUC der mit dem Bioscreen C zeitlich nachverfolgten Trübung bestimmt. Dargestellt sind jeweils die arithmetischen Mittel \pm S.E.M. der biologischen Replikate. Jedes biologische Replikat wurde als Triplikate gemessen, deren arithmetisches Mittel in die Auswertung einging. Der Einfluss jeder CQ-Konzentration auf das Wachstum von (A) Hefen, die mit Leerplasmid transformiert wurden (-), sowie von (B) Hefen, die den Wildtyp PfCRT^{3D7} exprimierten, wurden mit Ausnahme der niedrigsten und der höchsten Konzentration ($n = 1-2$) jeweils in 3-4 Experimenten bestimmt. Das CQ-abhängige Wachstum bei Expression von (C) PfCRT^{3D7}-K76T und (D) der CQR-Variante PfCRT^{Dd2} wurde jeweils in 2 beziehungsweise 2-4 Experimenten bestimmt. Aus den Dosis-Wachstums-Kurven (A-D) wurden die IC₅₀-Werte (E) ermittelt.

Aus der Regression der in der Dosis-Wachstums-Kurve dargestellten arithmetischen Mittel wurden die Konzentrationen an CQ bestimmt, die zu 50 % Wachstum führten (3.7) (Abb. 4.20, E). Diese legen nahe, dass der CQ-Influx über PfCRT^{3D7} und PfCRT-K76T ähnlich ist ($IC_{50} = (7,2 \pm 1,4) \mu\text{M CQ}$ bzw. $(5,6 \pm 0,2) \mu\text{M CQ}$). Ein niedrigerer IC_{50} für PfCRT^{Dd2} von $(4,1 \pm 0,3) \mu\text{M CQ}$ deutet einen stärkeren CQ-Influx in das Hefezytosol an. Im Vergleich zur Leerplasmid-Kontrolle ($IC_{50} = (38,2 \pm 11,8) \mu\text{M CQ}$) wurden die Hefen durch Expression von PfCRT^{3D7}/PfCRT^{3D7}-K76T um den Faktor 3-8, durch PfCRT^{Dd2} um den Faktor 6-12 sensibler gegenüber CQ im Kulturmedium.

Des Weiteren kennzeichnete PfCRT exprimierende Hefen eine Verlängerung der Generationszeit im Vergleich zur Leerplasmidkontrolle (Tab. 4.2). Die benötigte Zeit für eine Verdopplung der optischen Dichte in der exponentiellen Phase wurde aus den Messkurven der ohne Zusatz von CQ im Medium wachsenden Hefen berechnet. Die K76T-Mutante von PfCRT^{3D7} wich mit einer durchschnittlichen Generationszeit von 7 h von den anderen PfCRT-Isoformen (3D7: 3,6 h; Dd2: 5,5 h) ab. Um den Unterschied zu bestätigen, empfiehlt sich eine Vergrößerung des Stichprobenumfangs.

Tab. 4.2 Generationszeiten von exponentiell wachsenden, PfCRT exprimierenden *S. cerevisiae* im Vergleich zur Leerplasmidkontrolle (Arithmetisches Mittel \pm S.E.M.) bei 0 mM CQ im SD-AHLW-Medium.

Konstrukt	Generationszeit, h	n
(–)	$2,8 \pm 0,6$	3
PfCRT ^{3D7}	$3,6 \pm 0,3$	4
PfCRT ^{3D7} -K76T	$7,0 \pm 0,4$	2
PfCRT ^{Dd2}	$5,5 \pm 0,8$	4

4.2.3 Verapamil – Ein Substrat von PfCRT^{3D7}?

Der schwach basische Arzneistoff Verapamil (VP) aus der Klasse der Calciumantagonisten übt eine chemosensibilisierende Wirkung auf einige CQR-Plasmodien aus (Martin *et al.*, 1987). Untersuchungen an rekombinanten PfCRT-Proteinen in *X. laevis* Oozyten weisen auf eine Inhibition des PfCRT^{Dd2} vermittelten CQ-Transports hin, wobei CQ und VP keine Substrate des Wildtyp-Proteins sein sollen (Bellanca *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 2009). Da bereits abweichend von den Ergebnissen in *X. laevis* Oozyten, aber übereinstimmend mit den Studien von Baro *et al.* (2011) CQ als Substrat des Wildtyps in *S. cerevisiae* ermittelt wurde, wurde dies auch für VP phänotypisch untersucht. Die Trübung von PfCRT^{3D7} exprimierenden Hefen sowie der Leerplasmidkontrolle wurde in An- und Abwesenheit von CQ und VP in der Flüssigkultur mit dem Bioscreen C zeitlich verfolgt und die AUC als Maß für das Wachstum bestimmt (3.4.3). In einem Vortest beeinflussten bis zu 1 mM VP weder das Wachstum der Leerplasmidkontrolle noch das Ausmaß der Inhibition durch 10 mM CQ.

Bei Erhöhung der VP-Konzentration auf 5 mM wurde ein inhibitorischer Effekt auf das Hefewachstum (58 % Wachstum von der Kontrolle) festgestellt, welcher spezifisch für PfCRT^{3D7} exprimierende Hefen war (Abb. 4.21, violette Balken). Die Leerplasmidkontrolle wurde in dieser Konzentration weder von VP noch von CQ in ihrem Wachstum beeinträchtigt (Abb. 4.21, weiße Balken). Die durch 5 mM VP verursachte Wachstumsbeeinträchtigung der PfCRT^{3D7} exprimierenden Hefen war in ihrem Ausmaß der einer äquivalenten Konzentration CQ im Medium vergleichbar. Die Kombination aus CQ und VP übte einen additiven, inhibitorischen Effekt aus. In der höchsten Konzentration (je 5 mM) wurde das Wachstum auf ca. 15 % der Kontrolle reduziert. Die Untersuchung an sechs technischen Replikaten deutet darauf hin, dass neben CQ auch VP ein Substrat des in *S. cerevisiae* exprimierten Wildtyp-PfCRT^{3D7} ist und bei Übertritt in das Hefezytosol ebenfalls toxisch wirkt.

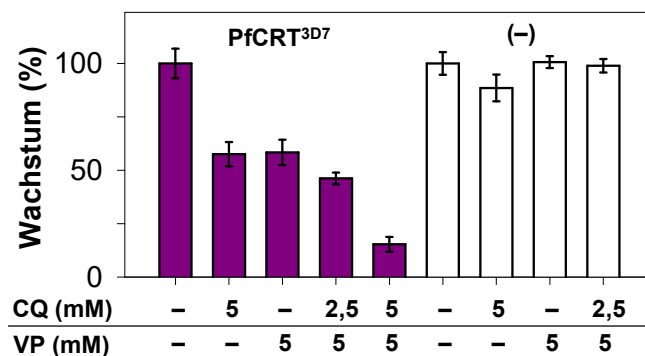


Abb. 4.21 Einfluss von Verapamil (VP) in An- und Abwesenheit von Chloroquin (CQ) auf das Wachstum von PfCRT^{3D7} exprimierenden *S. cerevisiae* (W303-1A). Hefesuspensionen wurden in An- und Abwesenheit der indizierten Konzentrationen CQ und VP in 100-Well-Platten kultiviert (V = 300 µl). Als Maß für das Wachstum wurde die AUC der mit dem Bioscreen C zeitlich nachverfolgten Trübung bestimmt. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichung aus sechs technischen Replikaten eines Experiments (n = 1).

4.2.4 Suche nach PfCRT-Inhibitoren in der Malaria-Box

Die Malaria-Box ist eine Substanzbibliothek der gemeinnützigen Organisation *Medicine for Malaria Venture* (MMV), welche diese bis 2015 Forschungsgruppen kostenfrei zur Förderung der Entdeckung und Entwicklung niedermolekularer Antimalariamittel zur Verfügung gestellt hat (www.mmv.org, o. D.). Aus 20.000 Substanzen, die größtenteils aus industriellen phänotypischen Screenings stammen, wählte die MMV 400 Substanzen aus, die ihren Anforderungen hinsichtlich einer breiten strukturellen Diversität, einer antiplasmodialen Aktivität gegen *P. falciparum* (3D7) ($EC_{50} < 4 \mu M$) und einer geringen Toxizität gegenüber HEK-Zellen entsprachen. Zur Hälfte besteht diese Bibliothek auch aus „drug-like“ Substanzen, deren physikochemischen Eigenschaften Lipinskis *Rule of Five* entsprechen und damit vermutlich oral verfügbar sind (Spangenberg *et al.*, 2013). Auf Grundlage der zuvor beschriebenen densitometrischen Messung zur Bestimmung des Phänotyps von PfCRT^{3D7}

exprimierenden Hefezellen wurde ein *rescue*-Assay zur Findung eines Inhibitors durchgeführt. Der Assay wurde analog zur Phänotyp-Bestimmung in einem 100-*well*-Plattenformat mit dem *Bioscreen C* durchgeführt (3.4.3). Von den Malaria-Box-Substanzen standen 390 von 400 zur Verfügung und wurden in einer Konzentration von je 10 μM auf eine Regeneration eines durch 10 mM CQ beeinträchtigten Phänotyps geprüft (Abb. 4.22, A). Kontrollen wurden auf jeder Platte in jeweils 7-10 technischen Repikaten mitgeführt. Die Kontrollhefen, die mit 10 mM CQ im Medium kultiviert wurden, erreichten $(15 \pm 6) \%$ des Wachstums der ohne CQ wachsenden Hefen (Arithmetisches Mittel \pm S.E.M., $n = 6$). Bei der Testung von 348 der 390 Substanzen (89 %) wurde zudem eine intermediär wachsende Kontrolle mit 5 mM CQ im Medium mitgeführt. Da die Chloroquin-Stammlösung vor jeder Verwendung frisch hergestellt wurde, wurde über das intermediäre Wachstum auf die generelle Fähigkeit der Hefen geprüft, in Anwesenheit von CQ zu wachsen, und diente als Kontrolle für die Durchführung des Assays. Die 5-mM-Kontrolle erreichte $(83 \pm 5) \%$ des Wachstums der 0-mM-Kontrolle (Arithmetisches Mittel \pm S.E.M., $n = 5$). Diese Werte werden der zuvor bestimmten Dosis-Wachstums-Beziehung von PfCRT^{3D7} exprimierenden *S. cerevisiae* gerecht (Vgl. Abb. 4.20, B) und bestätigen, dass die von CQ beeinträchtigten Phänotypen reproduzierbar beobachtbar sind. Zwei Bestimmungen wurden wiederholt, da die ohne CQ wachsenden Hefen kein Wachstum zeigten und sich daher kein Phänotyp bestimmen ließ.

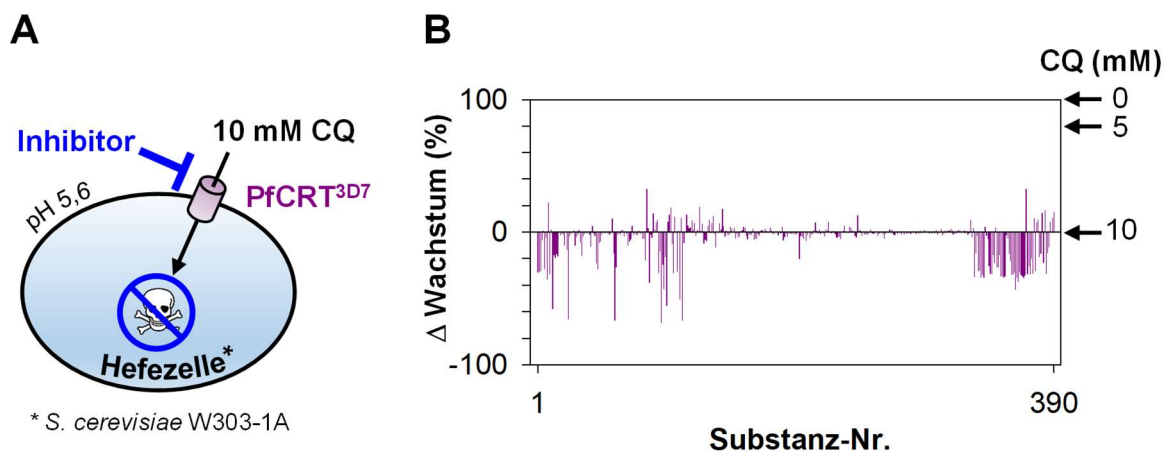


Abb. 4.22 Assay zur Findung eines PfCRT^{3D7}-Inhibitors in der Malaria-Box-Substanzbibliothek. (A) Die Anwesenheit von 10 mM Chloroquin im Kulturmedium (SD-AHLW, pH 5,6) verursachte eine PfCRT^{3D7} spezifische Wachstumsbeeinträchtigung von *S. cerevisiae*, welche durch eine Trübungsmessung mit dem *Bioscreen C* verfolgt wurde. Bei Zusatz einer Testsubstanz aus der Malaria-Box wurde auf eine Regeneration des Wachstums geprüft, welche eine Inhibition des PfCRT anzeigen würde. (B) Dargestellt ist die Veränderung des Wachstums in % bei Zusatz von je 10 μM der Testsubstanz (Nr. 1-390) im Vergleich zu den Kontrollen. Die AUC der Kontrollen wurde auf 100 % (kein CQ) bzw. 0 % (10 mM CQ im Medium) skaliert, wie zwei Pfeile indizieren. Ein weiterer Pfeil ordnet eine mit 5 mM CQ intermediär wachsende Kontrolle ein. 16 Substanzen wurden zweimal bestimmt. In diesen Fällen ist das arithmetische Mittel aufgetragen. Die DMSO-Konzentration betrug in allen Bedingungen 1,25 %.

Im Folgenden wurde in jeder Bestimmung die AUC der ohne CQ sowie mit 10 mM CQ wachsenden Hefen zu 100 % beziehungsweise 0 % skaliert. Das Wachstum der mit den Testsubstanzen wachsenden Hefen wurde auf das ihrer Kontrollen bezogen. Auf diese Weise zeigt ein negativer Wert eine Verschlechterung des Wachstums und ein positiver Wert eine Verbesserung des Wachstums im Vergleich zu 10-mM-Kontrolle an. Einen negativen Ausschlag zeigen 65 % der Testsubstanzen und sind damit potenziell als hefetoxischer als 10 mM CQ einzustufen. Eine vollständige Regeneration des Wachstums wurde mit keiner Testsubstanz beobachtet (Abb. 4.22, B). Folglich detektierte der Assay keinen Inhibitor von PfCRT^{3D7} in der Malaria-Box-Substanzbibliothek.

4.3 Untersuchungen zum Pentamidin-Aufnahmemechanismus über TbAQP2

Die hydrophobe Natur von Lipidmembranen stellt eine effektive Barriere gegen polare und geladene Substanzen dar und ist unverzichtbar für die Homöostase von Protonen und Ionen in einer Zelle (Watson, 2015). Ihre Konzentration zu beiden Seiten einer Lipidmembran kann durch den Einsatz von Ionophoren manipuliert werden (Woolley *et al.*, 1995). Diese Eigenschaft wurde auch zur Untersuchung der Pentamidin-Aufnahme in Trypanosomen genutzt. Der Aufnahmemechanismus von Pentamidin über TbAQP2 in Trypanosomen wird kontrovers diskutiert (Baker *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2016). Als Indiz für eine von einem Protonengradienten oder dem Membranpotenzial abhängigen Kanalpassage wurde eine verringerte Pentamidin-Aufnahme in prozyklischen (De Koning, 2001) und Blutform-Trypanosomen (Alghamdi *et al.*, 2020) nach Vorinkubation mit Ionophoren beobachtet. Ein Knockdown von drei H⁺-ATPasen in den trypanosomalen Plasmamembran führte außerdem zu einer etwa 8-fachen Erhöhung des EC₅₀ von Pentamidin (Alsford *et al.*, 2012). Eines der verwendeten Ionophore, Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP), welches eine Transmembranpassage von Protonen vermittelt, wurde näher untersucht. Dabei wurde eine direkte Inhibition von TbAQP2 gefunden (Alghamdi *et al.*, 2020). Dies wurde als Anlass genommen, den Einfluss von CCCP und zwei weiteren Ionophoren auf die Funktionalität der *T. brucei* Aquaglyceroporin-Isoformen 2 und 3 in Protoplasten von *S. cerevisiae* zu untersuchen, und zwar unter pH-neutralen Messbedingungen und mit dem neutralen, nicht protonierbaren Substrat Glycerol. Auf diese Weise sollte ermöglicht werden, direkte Effekte der Ionophoren auf die AQP-Funktionalität zu erkennen. Protoplastierte Hefezellen, die mit Leerplasmid transformiert waren, wurden als Kontrollen mitgeführt, um unspezifische Effekte auf die Integrität der Zellen durch die Ionophoren oder die Lösungsvermittler zu erkennen.

4.3.1 Funktionelle Expression von *T. brucei* Aquaglyceroporinen in *S. cerevisiae*

Vor Beginn der Ionophorstudien wurde die Expression der trypanosomalen Aquaglyceroporine in *S. cerevisiae* vom Stamm BY4742 Δ fps1 überprüft und deren Funktion im *Stopped-Flow*-Lichtstreuungsassay untersucht. TbAQP2 (35,4 kDa) und TbAQP3 (34,4 kDa) wurden im Vergleich zur Negativkontrolle, die nur mit dem Leerplasmid transformiert wurde, in den Hefen exprimiert (Abb. 4.23). Dazu wurden transformierte Zellen (3.1.2) nach dem mechanischen Aufschluss mit Glaskügelchen schrittweise zentrifugiert (3.4.1). Nach der Zentrifugation bei 10.000 g wurden die Zielproteine über ihren N-terminalen HA-tag in einem Western Blot detektiert (3.2.2).

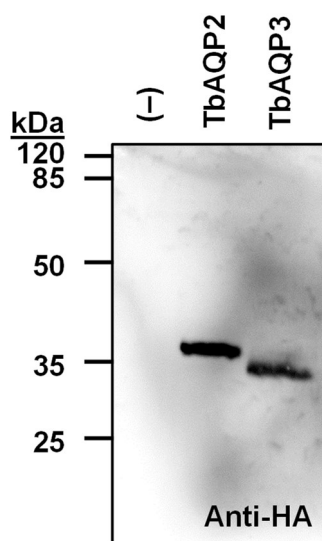


Abb. 4.23 Expression von TbAQP2 und TbAQP3 in *S. cerevisiae*. In der 10.000-*g*-Fraktion von aufgeschlossenen Hefezellen wurden TbAQP2 und TbAQP3 jeweils über ihren N-terminalen HA-tag unter Verwendung eines Anti-HA-Antikörpers bei einer Belichtungszeit von 3 min detektiert (*ChemoStar ECL & Fluorescence Imager*, Intas Science).

Im Permeabilitätsassay wurden protoplastierte, osmotisch sensible Hefezellen in einer *Stopped-Flow*-Apparatur mit einem äquivalenten Volumen an Assaypuffer gemischt (3.4.2). Der Assaypuffer enthielt Glycerol als Substrat für die untersuchten Aquaglyceroporine. Die Veränderung der Zellgröße, welche Rückschluss über die Permeabilität der Zellen gegenüber dem Substrat gibt, wurde über eine Lichtstreuungsmessung aufgezeichnet (Abb. 4.24, A). Die Funktionalität von TbAQP2 und des verwendeten Assays wurde über die Glycerolpermeabilität von TbAQP2 in hypertonen Bedingungen erfasst (Abb. 4.24, B). Bei einem nach innen gerichteten Glycerolgradienten von 300 mM betrug die Glycerolpermeabilitätsrate $3,5 \mu\text{m s}^{-1}$. Dieser Wert entspricht zuvor in der Arbeitsgruppe bestimmten Raten für TbAQP2 (Song *et al.*, 2016). Die verwendeten Methoden wurden als geeignet bewertet, um Einflüsse auf die Funktionalität der Aquaglyceroporine zu untersuchen.

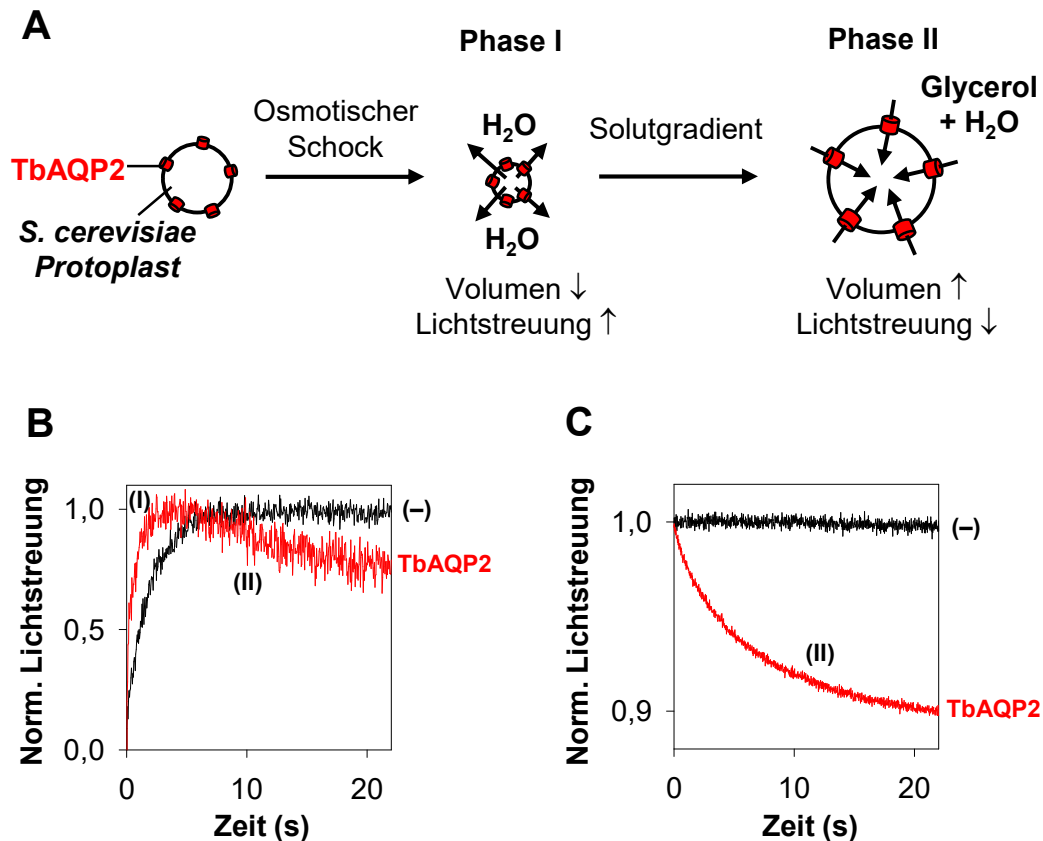


Abb. 4.24 Prinzip des Lichtstreuungsassays zur Funktionsuntersuchung von Aquaglyceroporinen. (A) Schematische Darstellung der Volumenänderung von Hefeprotoplasten, wenn diese einem osmotischen Schock und einem Substratgradienten ausgesetzt werden. (B) Zeitliche Veränderung der normierten Lichtstreuungsintensität von Hefeprotoplasten ohne (schwarze Kurve) und mit TbAQP2 (rote Kurve), wenn diese in der *Stopped-Flow*-Apparatur einem hypertonen Gradienten von ≥ 300 mM Glycerol ausgesetzt werden. Eine Verkleinerung der Protoplasten durch den osmotischen Wasserausstrom wird durch eine schnelle Zunahme der Lichtstreuungsintensität innerhalb weniger Sekunden (< 5 s) angezeigt. In Anwesenheit eines funktionalen Aquaglyceroporins in der Zellmembran nimmt das Protoplastenvolumen in einer zweiten, langsameren Phase durch Glyceroleinstrom aufgrund des nach innen gerichteten Glycerolgradienten wieder zu. Dies wird durch eine Abnahme des Lichtstreuungssignals angezeigt. (C) zeigt das Verhalten von TbAQP2 exprimierenden Hefeprotoplasten in einem isotonen Glycerolgradienten. Anstatt einer biphasischen Kurve wird nun eine monophasische Lichtstreuungskurve erhalten. Die Abnahme des Signals zeigt das Anschwellen der Protoplasten durch einen Glyceroleinstrom in die Zellen. Die in (B) und C) gezeigten Messkurven wurden durch Mittelung von je 6-9 technischen Replikaten und anschließende Normalisierung erhalten.

Für die nachfolgenden Experimente wurde von hypertonen Messbedingungen auf isotope Messbedingungen gewechselt. Dadurch sollte die Glycerolpermeabilität ohne Überlagerung durch einen osmotischen Schock und einen dadurch hervorgerufenen Wasserausstrom gemessen werden. Trotz des Justierens des Messpuffers wurde das AQP-spezifische Signal erst nach etwa 1 s beobachtet. Dies wurde bei der Normierung der Signalkurven berücksichtigt (3.4.2). Eine unterschiedliche Osmolarität im Inneren der AQP exprimierenden und der mit dem Leerplasmid transformierten Protoplasten könnte diesen Effekt erklären.

Für Hefen ist eine intrazelluläre Glycerolakkumulation beschrieben, wenn ein erleichterter Efflux des im Metabolismus anfallenden Glycerols durch die Deletion des endogenen Glycerolkanals Fps1 beeinträchtigt ist (Luyten *et al.*, 1995). Exemplarische Messkurven von TbAQP2 und kein AQP exprimierenden Hefeprotoplasten in hypertonen und isotonen Messbedingungen sind in Abb. 4.24 (B und C) gezeigt. In die mit dem Leerplasmid transformierten Hefen (–) war der Glycerolinflux aufgrund der Deletion von Fps1 minimal. Dies erlaubte die gesonderte Betrachtung des AQP vermittelten Glycerolinfluxes.

4.3.2 Einfluss von Ionophoren auf die Funktion von TbAQP2 und TbAQP3

CCCP inhibiert selektiv TbAQP2 im einstelligen mikromolaren Bereich

Nach Vorinkubation mit CCCP, welches als schwache Säure (Abb. 4.25, A) als Protonophor wirkt (Kasianowicz *et al.*, 1984), wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion der Glycerolpermeabilität von TbAQP2 exprimierenden Hefezellen beobachtet (Abb. 4.25, B). Die Steigung der Messkurve, welche ein Maß für die Glycerolpermeabilität ist, nahm in den ersten Sekunden mit zunehmender CCCP-Konzentration ab. Bei Zusatz von 100 μM CCCP wurde eine annähernd horizontale Messkurve erhalten, welche einer vollständigen Inhibition entspricht. In der Abbildung sind exemplarisch Messkurven ausgewählter CCCP-Konzentrationen dargestellt, um die konzentrationsabhängige Inhibition zu zeigen. Die Steigung der Lichtstreuungsmesskurven in der Anfangsphase der Messung wurde je nach Geschwindigkeit der Glycerolpermeabilität durch exponentielle oder lineare Regression ermittelt. Unter Berücksichtigung der Steigung der Negativkontrolle wurde diese zu der Steigung nicht inhibierter TbAQP2-Hefezellen ins Verhältnis gesetzt. Für die Ermittlung der halbmaximalen Inhibitionskonzentration wurden weitere, nicht dargestellte Konzentrationen getestet sowie die gemessenen Inhibitionswerte mehrfach bestimmt.

Die Auftragung der prozentualen Inhibition gegen den Logarithmus der CCCP-Konzentration ergab einen sigmoidalen Verlauf der Datenpunkte. Für die Konzentration, die zu 50 % Inhibition der Glycerolpermeabilität führte, wurde für TbAQP2 ein einstelliger mikromolarer Wert ermittelt ($\text{IC}_{50} = (2,0 \pm 0,3) \mu\text{M}$) (Abb. 4.25, D). Um den Einfluss von CCCP auf die Funktion eines Aquaglyceroporins mit kanonischem Selektivitätsfilter zu untersuchen, wurden die Messungen analog mit TbAQP3 exprimierenden Hefezellen durchgeführt. Die Glycerolpermeabilität von TbAQP3 wurde durch CCCP schwächer beeinflusst (Abb. 4.25, C). Die höchste getestete Konzentration von 1 mM CCCP führte zu etwa 50 % Inhibition (Abb. 4.25, E). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von CCCP in Kombination mit dem Risiko einer Verstopfung der Testapparatur wurde die Testung höherer Konzentrationen unterlassen. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der IC_{50} -Wert im Bereich von 1 mM liegt.

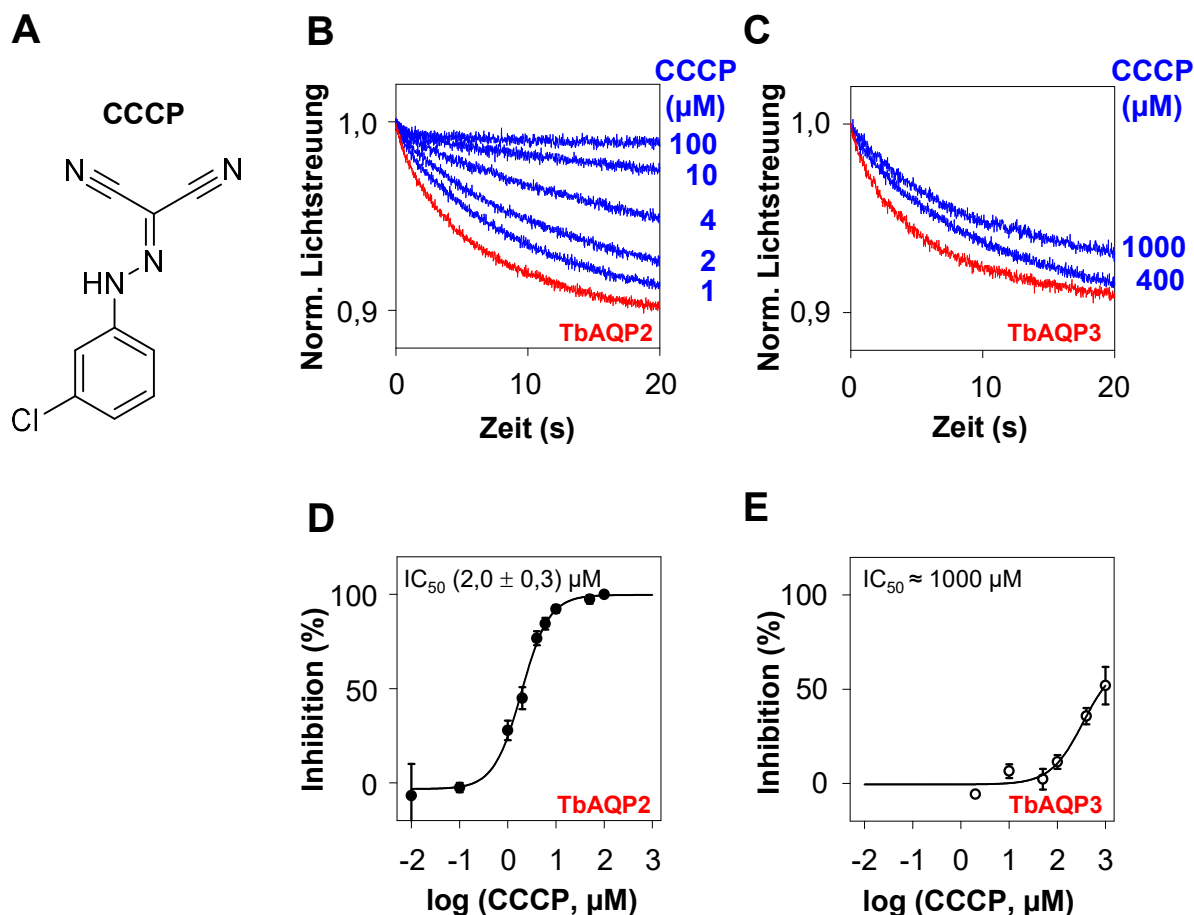


Abb. 4.25 Konzentrationsabhängige Inhibition von TbAQP2 und TbAQP3 durch CCCP. (A) Strukturformel von CCCP. Normalisierte Lichtstreuungskurven von (B) TbAQP2 und (C) TbAQP3 exprimierenden *S. cerevisiae* Protoplasten bei einem nach innen gerichteten Glycerolgradienten (≥ 300 mM) jeweils in Abwesenheit (rote Kurve) und in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von CCCP (blaue Kurven). Konzentrationen < 400 µM CCCP sind zum Zwecke einer besseren Anschaulichkeit nicht gezeigt. Es wurden je Kurve 7-9 technischen Replikate gemittelt. Die Dosis-Wirkungskurve zeigt die konzentrationsabhängige prozentuale Inhibition von (D) TbAQP2 und (E) TbAQP3, die aus den Steigungen der Messkurven abgeleitet wurde. In (D) und (E) sind die arithmetischen Mittel \pm S.E.M. aus mindestens zwei Bestimmungen angegeben ($n = 2-5$). In allen Messungen wurde die Konzentration des Lösungsvermittlers DMSO ≤ 1 % gehalten.

Nigericin beeinflusst nicht die Glycerolpermeabilität von TbAQP2 und TbAQP3

Analog zu den CCCP-Testungen wurde der Einfluss von Nigericin auf die Glycerolpermeabilität von TbAQP2 und TbAQP3 untersucht. Nigericin ist eine schwache Säure (Abb. 4.26, A), die über ihre Carboxylfunktion als H^+/K^+ -Austauscher wirkt (Pressman *et al.*, 1967). Die Vorinkubation der Protoplasten mit Nigericin-Konzentrationen von bis zu 100 µM führte zu keiner Veränderung des Lichtstreuungssignals in Anwesenheit eines nach innen gerichteten Glycerolgradienten (Abb. 4.26, B und C, blaue Kurven) im Vergleich zu dem Signal, das für dieselbe Protoplasten-Präparation nach Vorinkubation mit einer entsprechenden Menge Ethanol ohne Nigericin erhalten wurde (Abb. 4.26, B und C, rote Kurven).

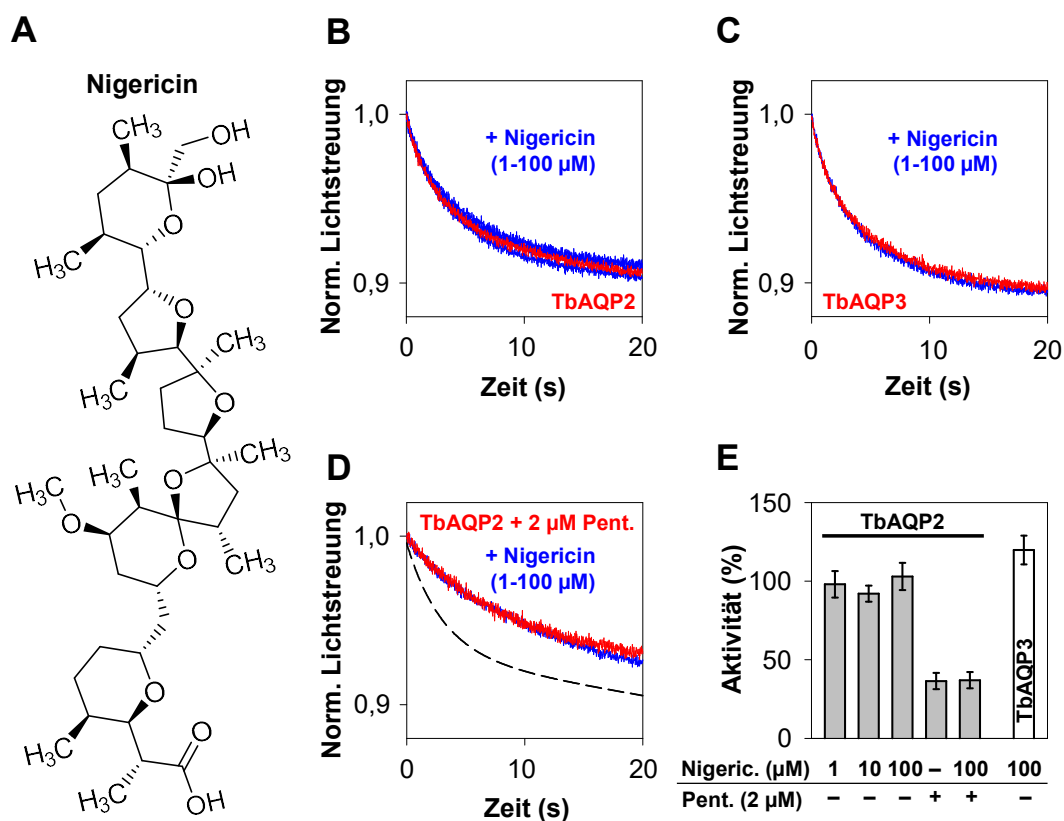


Abb. 4.26 Einfluss von Nigericin auf die Funktionalität von TbAQP2 und TbAQP3. (A) Strukturformel von Nigericin. Normalisierte Lichtstreuungskurven von (B) TbAQP2 und (C) TbAQP3 exprimierenden Protoplasten jeweils ohne (rote Kurve) und mit Nigericin (blaue Kurven) bei einem nach innen gerichteten Glycerolgradienten (≥ 300 mM). (D) Durch Zugabe von 2 μ M Pentamidin wurde die Glycerolpermeabilität von TbAQP2 partiell gehemmt (rote Kurve). Die gestrichelte Linie in (D) deutet ungehemmte TbAQP2-Protoplasten an. Die Vorbehandlung mit bis 100 μ M Nigericin (blaue Kurve) veränderte das Lichtstreuungssignal für die durch Pentamidin gehemmten Protoplasten nicht. (E) Darstellung der aus den Lichtstreuungskurven abgeleiteten relativen Aktivität von TbAQP2 (graue Balken) und TbAQP3 (weißer Balken), wenn die Protoplasten mit Nigericin und/oder Pentamidin vorbehandelt wurden. Die in (B) und (C) gezeigten Kurven wurden durch Mittelung von 6-9 technischen Replikaten, die in (D) gezeigten Kurven durch Mittelung von 5-8 technischen Replikaten erhalten und normalisiert. Die in (E) dargestellte relative Aktivität stellt die arithmetischen Mittel \pm S.E.M. aus mindestens zwei Bestimmungen dar ($n = 2-3$). Die Konzentration von Ethanol zur Lösungsvermittlung betrug in allen Bestimmungen 1 %.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Nigericin auf die Pentamidin-Inhibition von TbAQP2 untersucht. Pentamidin inhibierte die Glycerolpermeabilität von TbAQP2, nicht jedoch die von TbAQP3 (Song *et al.*, 2016). In Abb. 4.26 (D) zeigt die rote Lichtstreuungskurve die erniedrigte Glycerolpermeabilität von TbAQP2 nach Vorinkubation der Protoplasten mit 2 μ M Pentamidin an. Die in Abb. 4.26 (D) gezeigten blauen Kurven zeigen exemplarisch die Lichtstreuungskurven, wenn vor Zugabe von Pentamidin die Protoplasten mit Nigericin vorbehandelt wurden. Diese decken sich mit der roten Kurve. Nigericin beeinflusste also nicht den inhibitorischen Effekt von Pentamidin auf die TbAQP2-Funktionalität. Die Konzentration an Ethanol wurde bei beiden Messungen konstant bei 1 % gehalten.

Die in Abb. 4.26 (E) dargestellten relativen Aktivitäten von TbAQP2 und TbAQP3 ($n = 2-3$) verdeutlichen, dass Nigericin weder allein noch in Kombination mit Pentamidin die Aquaglyceroporin-Permeabilität für Glycerol veränderte.

Gramicidin inhibiert in einem ähnlichen Ausmaß TbAQP2 und TbAQP3

Als letztes Ionophor wurde Gramicidin in einer ethanolischen Lösung untersucht. Zwei Gramicidin-Moleküle bilden eine die Membran durchspannende Pore (Hladky & Haydon, 1970, 1972), wie die Struktur in Abb. 4.27 (A) verdeutlicht. Nach Vorinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gramicidin wurde sowohl für TbAQP2 als auch TbAQP3 eine konzentrationsabhängige Inhibition der Glycerolpermeabilität beobachtet (Abb. 4.27, B und C). Der Zusatz an Gramicidin zum Messsystem war durch die niedrige Wasserlöslichkeit und die von den Protoplasten noch tolerierbare Ethanolkonzentration limitiert, sodass eine maximale Inhibition nicht erreicht werden konnte. Dennoch wurden genügend Datenpunkte erhalten, um die relativen Inhibitionswerte sigmoidal zu fitten und einen IC_{50} -Wert zu bestimmen (Abb. 4.27, D und E). Für TbAQP2 wurde dieser zu $(72 \pm 8) \mu\text{M}$ Gramicidin und für TbAQP3 zu $(57 \pm 3) \mu\text{M}$ Gramicidin bestimmt.

Da die IC_{50} -Werte aus der Regression der mehrfach bestimmten Datenpunkte abgeleitet wurden, war ein direkter statistischer Vergleich der IC_{50} -Werte durch die Anwendung eines t-Tests nicht möglich. Für die Inhibition von TbAQP2 und TbAQP3 durch die drei höchsten Gramicidin-Konzentrationen lagen genügend Datenpunkte vor, um jeweils paarweise zu testen, ob es Hinweise auf eine unterschiedliche Inhibition von TbAQP2 und TbAQP3 gibt.

Zunächst wurde auf die Voraussetzungen für die Anwendung eines t-Tests geprüft (3.8). Es wurde geprüft, dass die Datenpunkte normal verteilt und die Varianzen homogen sind (Tab. 4.3). Da die Prüfsumme im David-Hartley-Pearson-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % innerhalb der Intervallgrenzen lag, wurde eine Normalverteilung für die Messwerte angenommen. Im F-Test konnte die Nullhypothese beibehalten werden, dass kein Unterschied zwischen den Varianzen der TbAQP2- und der TbAQP3-Inhibition vorliegt. Die Prüfsummen waren jeweils kleiner als die tabellierten F-Werte und die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese trotz vorliegender Normalverteilung abzulehnen (fehlerhafte Entscheidung), war jeweils größer als die Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5 %. Damit waren die statistischen Voraussetzungen für die Anwendung eines t-Tests erfüllt.

Nach Anwendung eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests gab es auf einem Signifikanzniveau von 95 % keine Hinweise für einen signifikanten Unterschied zwischen den Inhibitionswerten von TbAQP2 und TbAQP2 durch $\geq 50 \mu\text{M}$ Gramicidin (Tab. 4.4).

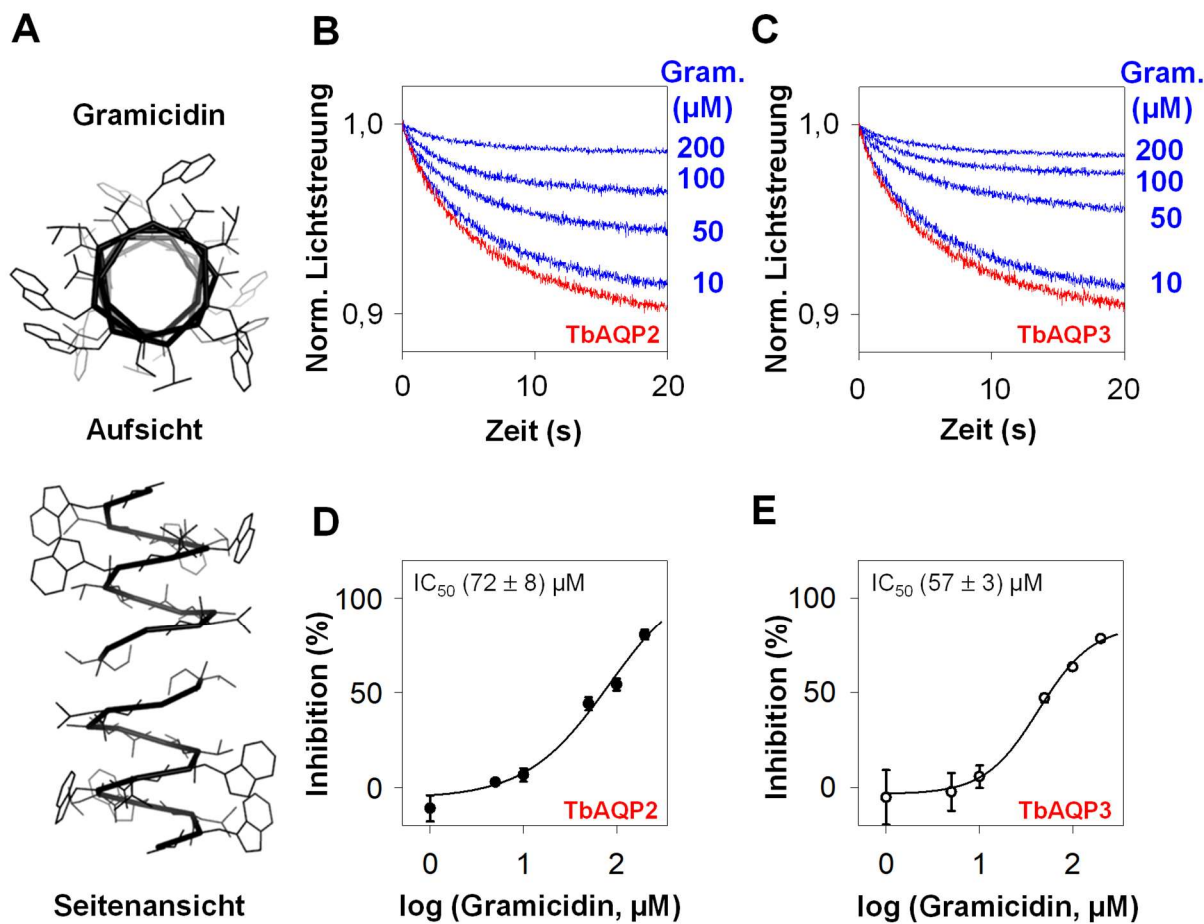


Abb. 4.27 Konzentrationsabhängige Inhibition von TbAQP2 und TbAQP3 durch Gramicidin. (A) Struktur des aus zwei Gramicidin-Molekülen bestehenden Ionenkanals (PDB #1mag), erstellt von E. Beitz. Normalisierte Lichtstreuungskurven von (B) TbAQP2 und (C) TbAQP3 exprimierenden Protoplasten jeweils ohne (rote Kurve) und mit Gramicidin (blaue Kurven) bei einem nach innen gerichteten Glycerolgradienten (≥ 300 mM). (D) Aus den Lichtstreuungskurven wurde die relative Inhibition von TbAQP2 durch Gramicidin abgeleitet, welche hier als Dosis-Wirkungskurve dargestellt ist. (E) Die Dosis-Wirkungskurve von TbAQP3 zeigt eine ähnliche konzentrationsabhängige Inhibition durch Gramicidin. Die in (B) und (C) gezeigten Kurven wurden durch Mittelung von 8-9 technischen Replikaten erhalten und normalisiert. In (D) und (E) sind die arithmetischen Mittel \pm S.E.M. aus mindestens zwei Bestimmungen angegeben ($n = 2-3$). Die Konzentration von Ethanol zur Lösungsvermittlung betrug mit einer Ausnahme in allen Messungen 1 %. Für die Testung von 200 μM Gramicidin war eine Ethanolkonzentration von 2 % nötig. Die Ethanolkonzentration in den Kontrollmessungen wurde entsprechend ebenfalls auf 2 % angepasst.

Tab. 4.3 Test auf Normalverteilung und auf Varianzenhomogenität der Inhibition (%) von TbAQP2 und TbAQP3 durch Gramicidin.

Gram. (μM)	AQP	M	σ^2	David-Hartley- Pearson-Test		F-Test ($H_0: \sigma_2^2 = \sigma_1^2$)	
				Intervallgrenzen ($n = 3; \alpha = 0,05$)	Prüfsumme	F ($f_1, f_2 = 2$) ($\alpha = 0,05$)	Prüfsumme
50	2	44,0	34,3	[1,758; 1,999]	1,92	19,00	2,23
	3	47,0	15,4		1,79		($p = 0,31$)
100	2	54,0	28,1		1,99		3,60
	3	63,3	7,8		1,85		($p = 0,22$)
200	2	80,4	18,4		1,83		2,27
	3	78,2	8,1		1,89		($p = 0,31$)

Bemerkung: M = Arithmetisches Mittel; σ^2 = Varianz; n = Stichprobengröße; f = Freiheitsgrade;
 α = Irrtumswahrscheinlichkeit; H = Hypothese; F = kritischer F-Wert;
 Prüfsumme = Empirische Teststatistik, die mit den Intervallgrenzen oder dem kritischen F-Wert
 verglichen wird.

Tab. 4.4 Vergleich der Inhibition von TbAQP2 und TbAQP3 durch Gramicidin durch Anwendung eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests.

t-Test ($H_0: M_1 = M_2$)		
Messreihe: Gram. (μM)	Kritischer t-Wert ($f = 4; \alpha = 0,05$)	Berechneter t-Wert
50	2,78	0,73 ($p = 0,51$)
100		2,67 ($p = 0,06$)
200		0,74 ($p = 0,50$)

Bemerkung: M = Arithmetisches Mittel; f = Freiheitsgrade; α = Irrtumswahrscheinlichkeit;
 H = Hypothese.

Es wurde gezeigt, dass Ionophore einen direkten Einfluss auf die Funktionalität eines Aquaglyceroporins haben können, wobei die Funktionalität in Protoplasten von *S. cerevisiae* über die Permeabilität für das neutrale AQP-Substrat Glycerol in einem neutralen Assaypuffer biophysikalisch bestimmt wurde. Zwei der drei getesteten Ionophore hatten einen inhibitorischen Effekt auf die untersuchten Aquaglyceroporine, TbAQP2 und TbAQP3. Für CCCP scheint eine direkte Interaktion mit den AQPs denkbar. Dies lässt zumindest die unterschiedliche Potenz gegenüber TbAQP2 und TbAQP3 vermuten, die sich in ihren Selektivitätsfiltern unterscheiden. Nigericin beeinflusste weder ohne noch in Kombination mit Pentamidin die Funktionalität der Aquaglyceroporine. Für Gramicidin ist auszugehen, dass dieses TbAQP2 und TbAQP3 gleichermaßen inhibiert. Als integraler Porenbilder ist eine direkte Interaktion, wie sie für das kleinen Molekül CCCP vermutet werden kann, eher unwahrscheinlich.

4.3.3 Pentamidin-Biotin: Ein für Trypanosomen nicht toxischer TbAQP2-Inhibitor

Mit einem biotinkoppelten Pentamidin-Derivat sollte die Endozytose-Hypothese (Song *et al.*, 2016) experimentell überprüft werden. Pentamidin-Biotin **9** wurde von B. Henke (Pharmazeutisches Institut, CAU, Kiel) synthetisiert. Der Biotin-Rest ermöglichte eine Bindung an Streptavidin, für welches es kommerziell verfügbare Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate gibt, sowie eine Detektion über Anti-Biotin-Antikörper. Pentamidin stellt einen potenten Inhibitor der TbAQP2 vermittelten Glycerolpermeabilität dar ($IC_{50} \approx 130$ nM; Song *et al.*, 2016). Für Pentamidin-Biotin **9** wurde daher zunächst untersucht, ob und in welchem Maße dieses in der Lage ist, die Funktionalität von TbAQP2 zu beeinträchtigen.

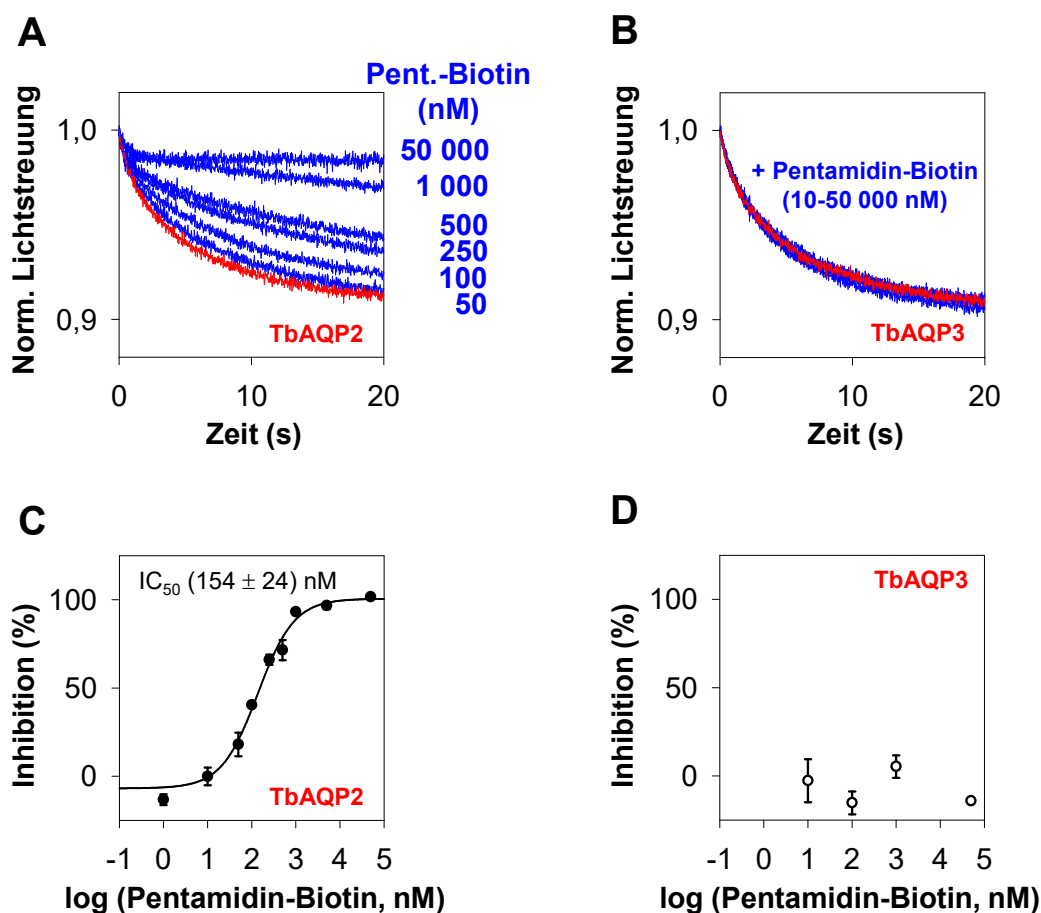


Abb. 4.28 Einfluss von Pentamidin-Biotin auf die Funktionalität von TbAQP2 und TbAQP3. (A) Normalisierte Lichtstreuungskurven von (A) TbAQP2 und (B) TbAQP3 exprimierenden *S. cerevisiae* Protoplasten bei einem nach innen gerichteten Glycerolgradienten (≥ 300 mM) jeweils in Abwesenheit (rote Kurve) und in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von Pentamidin-Biotin (blaue Kurven). (C) Die Dosis-Wirkungskurven von (C) TbAQP2 und (D) TbAQP3 zeigen die aus den Lichtstreuungskurven abgeleitete relative Inhibition durch Pentamidin-Biotin. Die in (A) und (B) gezeigten Kurven wurden durch Mittelung von 8-9 technischen Replikaten erhalten und normalisiert. In (C) und (D) sind die arithmetischen Mittel \pm S.E.M. dargestellt. In (C) wurden alle Konzentrationen mit Ausnahme der höchsten mindestens zweimal getestet ($n = 2-3$). In (D) wurden alle Konzentrationen in zwei Experimenten getestet ($n = 2$). Die Konzentration von DMSO zur Lösungsvermittlung betrug ≤ 1 %.

Dazu wurde der biophysikalischen Lichtstreuungsassay mit denselben Messbedingungen verwendet, mit denen auch die Ionophore untersucht wurden (3.4.2). Dabei wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt von Pentamidin-Biotin **9** auf die Lichtstreuungskurven von TbAQP2 exprimierenden Protoplasten beobachtet. In Anwesenheit des isotonen Gradienten von ≥ 300 mM Glycerol nahm die Steigung und die Kapazität der Lichtstreuungskurven mit zunehmender Pentamidin-Biotin-Konzentration ab (Abb. 4.28, A). Die aus den Lichtstreuungskurven abgeleitete Inhibition der TbAQP2 vermittelten Glycerolpermeabilität ergab eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve mit einem IC_{50} -Wert von (154 ± 24) nM Pentamidin-Biotin **9** (Abb. 4.28, C). Das Ausmaß der Inhibition war damit mit der Originalsubstanz vergleichbar. Song *et al.* (2016) zeigten, dass Pentamidin spezifisch TbAQP2, nicht jedoch TbAQP3 inhibiert. Dies wurde für Pentamidin-Biotin **9** angesichts der bereits gezeigten, ähnlichen Potenz ebenso erwartet und durch Testung von TbAQP3 exprimierenden Protoplasten überprüft. Die Vorbehandlung mit bis zu 50 μ M Pentamidin-Biotin **9** führte zu keiner Änderung der Lichtstreuungskurven im Vergleich zu unbehandelten TbAQP3-Protoplasten (Abb. 4.28, B). Dies wird in Abb. 4.28 (D) durch Darstellung der relativen Inhibition (% von der TbAQP3-Kontrolle), welche für alle getesteten Pentamidin-Biotin-Konzentrationen um 0 % schwankt, veranschaulicht.

In Kooperation mit D. Horn und J. C. Faria (*School of Life Sciences, University of Dundee, UK*), wurde der Einfluss von Pentamidin-Biotin **9** auf die Viabilität von Trypanosomen untersucht. Die Kultivierung der Trypanosomen wurde von J. Faria durchgeführt. Unter ihrer Anleitung wurde gemeinschaftlich ein *AlamarBlue*®-Viabilitätsassay durchgeführt (3.5). Die Testung wurde an einer Wildtyp-Parasitenlinie (2T1; Alsford & Horn, 2008) durchgeführt, die alle drei Aquaglyceroporine exprimiert, sowie an einer TbAQP2-Knockout-Linie (Δ AQP2; Baker *et al.*, 2012). Zeitgleich mit der Testung von Pentamidin-Biotin **9** wurde auch als Positivkontrolle der EC_{50} von Pentamidin bestimmt. Als Kontrolle für eine maximale Erniedrigung der Zellviabilität (EC_{100}) wurde eine Konzentration von 100 nM Pentamidin eingesetzt. Da diese Konzentration für Pentamidin-Biotin **9** unbekannt war, wurde ein deutlich höherer Konzentrationsbereich getestet. Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten von zwei Experimenten ergab, dass Pentamidin-Biotin **9** auch in der höchsten Testkonzentration von 8000 nM zu keiner Beeinträchtigung der Zellviabilität der beiden getesteten Parasitenlinien führte (Abb. 4.29, B).

Für Pentamidin wurde ein EC_{50} -Wert von $(0,9 \pm 0,1)$ nM in der Wildtyp-Linie (2T1) sowie von $(10,7 \pm 0,7)$ nM in der TbAQP2-Knockout-Linie (Δ AQP2) bestimmt (Abb. 4.29, A). Die Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve bei Fehlen von TbAQP2 ist ein Anzeichen einer Resistenz und verdeutlicht die Bedeutung von TbAQP2 für die Aufnahme von Pentamidin in die Trypanosomen. Die bestimmten EC_{50} -Werte sind dabei in ihrer Größenordnung mit Literaturwerten für die 2T1-Linie (2 nM, Alsford *et al.*, 2012; 3 nM; Baker *et al.*, 2012) und einer

Knockoutlinie (Δ AQP2: 51 nM, Baker *et al.*, 2012; Δ AQP2/3: 37 nM, Alsford *et al.*, 2012) vergleichbar. Daher ist davon auszugehen, dass eine Toxizität von Pentamidin-Biotin **9** in demselben Experiment nicht unentdeckt blieb.

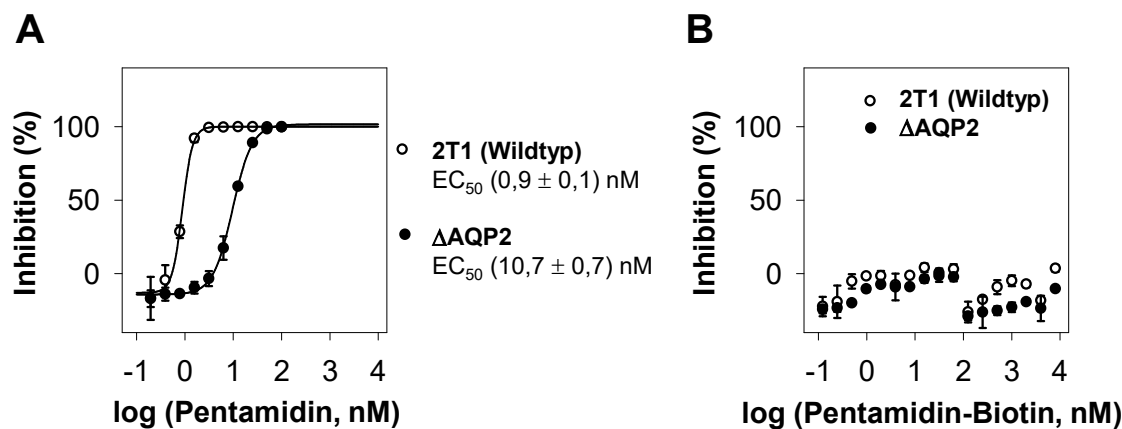


Abb. 4.29 Einfluss von Pentamidin und Pentamidin-Biotin auf die Viabilität von Trypanosomen. (A) Über einen Resazurin-Viabilitätsassay wurde der EC₅₀ von Pentamidin in Wildtyp-Trypanosomen (2T1), die alle drei Aquaglyceroporine exprimieren, sowie in TbAQP2-Knockout-Trypanosomen (Δ AQP2) bestimmt. Die Dosis-Wirkungskurve ist bei Fehlen von TbAQP2 nach rechts zu höheren Konzentrationen verschoben. (B) Die Dosis-Wirkungskurve von dem Derivat Pentamidin-Biotin **9** zeigt keine Inhibition der Zellen im genannten Resazurin-Viabilitätsassay. Die in (A) und (B) gezeigten Daten stellen die arithmetischen Mittel \pm S.E.M. aus zwei Experimenten dar, in denen jeweils jede Konzentration in Triplikaten getestet wurde. Die trypanozide Wirkung von Pentamidin diente als maximale Inhibitionskontrolle für die getesteten Trypanosomen.

Im nächsten Schritt wurde gemeinschaftlich mit J. C. Faria versucht, die Endozytose-Theorie fluoreszenzmikroskopisch zu überprüfen. Die Kultivierung der Trypanosomen sowie die Mikroskopie wurde dabei von J. C. Faria durchgeführt, wobei sie Unterstützung bei der Durchführung, insbesondere bei der Anfärbung der Mikroskopieproben (3.6) erhalten hat. Nach Inkubation von Wildtyp-Trypanosomen (2T1) mit Pentamidin-Biotin **9** sollte dieses in den Zellen visualisiert werden. Als Kontrolle dienten Trypanosomen mit einem Triple-Knockout, die keines der drei endogenen Aquaglyceroporine exprimierten (Δ AQP1-3). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Pentamidin-Biotin **9** (50 nM, 500 nM, 5 μ M) oder DMSO bei 37 °C inkubiert. Tab. 4.5 gibt die untersuchten Zeitpunkte an, nach denen die Inkubation beendet wurde, sowie die getesteten Markierungsoptionen nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Zur Visualisierung von Pentamidin-Biotin **9** wurde sowohl ein Alexa-Fluor®-488-Streptavidin-Konjugat als auch die Kombination aus einem Anti-Biotin-Primärantikörper und einem Alexa Fluor® 488 gekoppelten Sekundärantikörper für beide genannten Zelllinien und alle zuvor genannten Konzentrationen an Pentamidin-Biotin **9** und DMSO getestet (3.6). Die in Abb. 4.30 gezeigten immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind repräsentativ für für alle in Tab. 4.5 aufgeführten Zeitpunkte und Markierungsbedingungen.

Tab. 4.5 Untersuchte Bedingungen für die Immunfluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung von Pentamidin-Biotin in Trypanosomen.

Inkubationszeit mit Pentamidin-Biotin (min)	Alexa-Fluor®-488-Streptavidin	Anti-Biotin-Antikörper
Je 5, 15, 30	1:250	1:100
Je 5, 15, 30	1:500	1:500
Je 5, 15, 30	-	1:1000

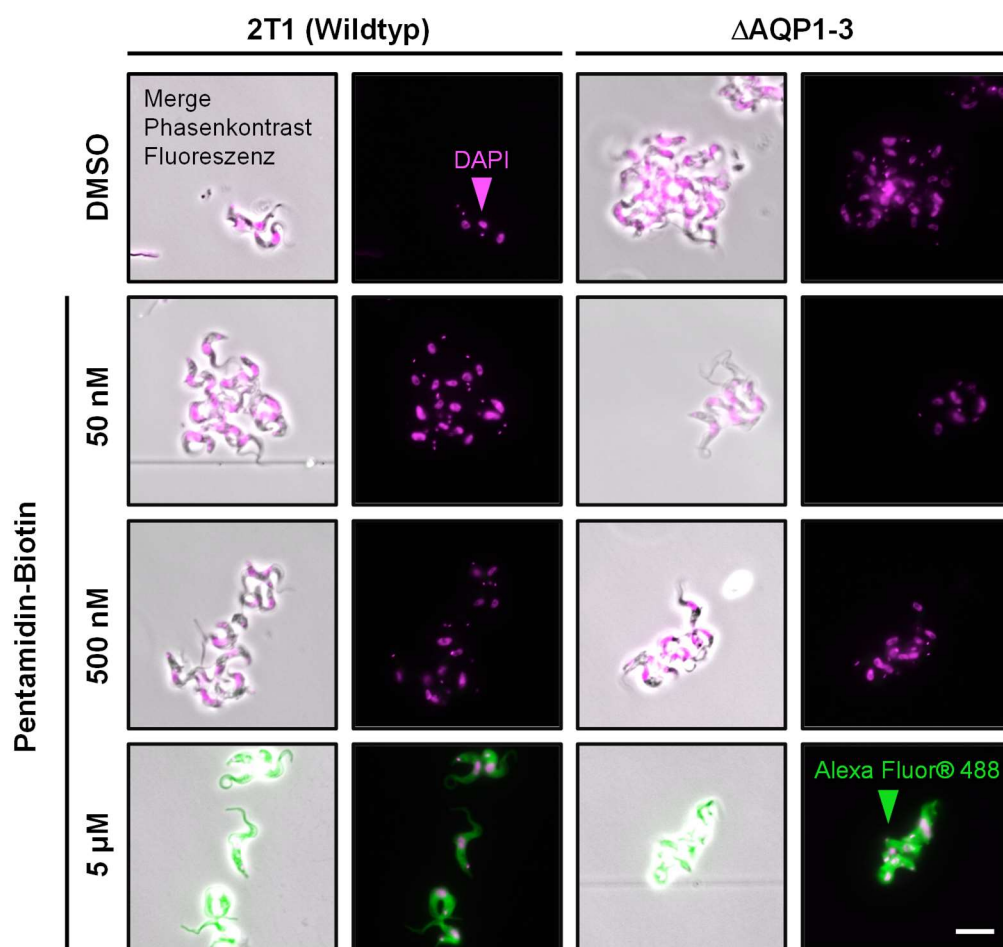


Abb. 4.30 Visualisierung von Pentamidin-Biotin in Trypanosomen mit einem Alexa-Fluor®-488-Streptavidin-Konjugat. Dargestellt sind Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen, die mit Pentamidin-Biotin **9** behandelt wurden, welches nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit Alexa-Fluor®-488-Streptavidin (grün) (1:250) markiert wurde. Der Zellkern und die Kinetoplast-DNA wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (pink) fluoreszenzmarkiert. Pentamidin-Biotin **9** haftete konzentrationsabhängig und unspezifisch sowohl an Trypanosomen vom Wildtyp (2T1) als auch an solchen mit einem Triple-AQP-Knockout (ΔAQP1-3). Die Inkubation mit Pentamidin-Biotin **9** betrug in jeder Bedingung jeweils 30 min bei 37° C. Der weiße Strich zeigt eine Länge von 5 μm an.

Nur mit DMSO behandelte Zellen zeigten keine gegen Biotin gerichtete Fluoreszenzmarkierung. Die verwendeten Markierungsmethoden führten folglich zu keiner unspezifischen Hintergrundfluoreszenz. Mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurde der Nukleus und die Kinetoplastid-DNA fluoreszenzmarkiert. Folglich sind je Parasitenzelle zwei DNA-Markierungen zu erkennen. Der kleinere Kinetoplastid befindet sich dabei in direkter Nachbarschaft zur Flagellartasche. Ab 5 μM Pentamidin-Biotin **9** wurde ein Fluoreszenzsignal für Alexa Fluor® 488 in beiden Zelllinien detektiert (Abb. 4.30), wobei in einigen Fällen dieses bereits auch bei Konzentration von 500 nM in beiden Zelllinien zu erkennen war. Pentamidin-Biotin **9** wurde folglich konzentrationsabhängig markiert. Diese Markierung war jedoch nicht spezifisch, da die Triple-AQP-Knockout-Zellen im gleichen Maße markiert wurden. Durch die Permeabilisierung der Zellen mit Triton™ X-100 sollte eine intrazelluläre Markierung ermöglicht werden. Um intrazelluläre von oberflächlichen Signalen zu unterscheiden, wurde das Experiment mit 5 μM Pentamidin-Biotin **9** mit und ohne Permeabilisierung wiederholt. Zur Detektion wurden jeweils die stärksten Verdünnungen von Alexa-Fluor®-488-Streptavidin und der Antikörper verwendet, da diese gleichermaßen gute Signale zeigten wie niedrigere Verdünnungen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten keinen Unterschied in den getesteten Bedingungen. Ohne Permeabilisierung wäre bei verstärkter intrazellulärer Lokalisation des Pentamidin-Biotins **9** ein schwächeres Fluoreszenzsignal zu erwarten gewesen. Folglich deutete dies auf ein von TbAQP2 unabhängiges Anheften der Moleküle an die Oberfläche der Trypanosomen hin.

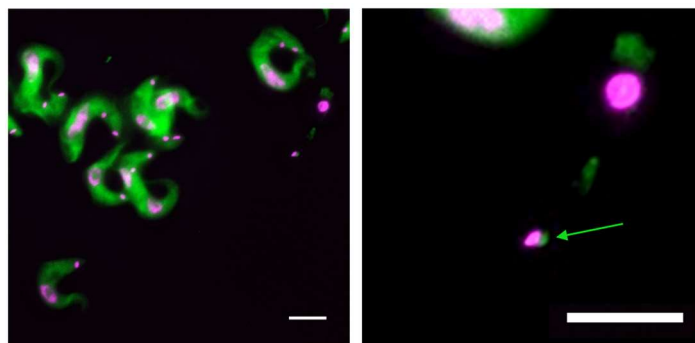


Abb. 4.31 Abweichende Markierung von Pentamidin-Biotin in einer einzelnen Zelle. 5 μM Pentamidin-Biotin **9** wurden für 5 min mit den Trypanosomen inkubiert und nach Fixierung der Zellen mit einem Alexa-Fluor®-488-Streptavidin-Konjugat (grün) (1:250) ohne vorherige Permeabilisierung visualisiert. Der weiße Strich zeigt jeweils eine Länge von 5 μm an. Der Pfeil markiert die fluoreszenzmarkierte Flagellartasche in Nähe zur mit DAPI (pink) markierten Kinetoplastid-DNA.

Eine einzelne Zelle zeigte eine konzentrierte Fluoreszenz in der Nähe der Kinetoplastid-DNA und markierte somit die Flagellartasche (Abb. 4.31). Dies könnte ein Hinweis auf ein anderes VSG-Protein auf der Oberfläche dieser einzelnen Zelle sein. Trypanosomen exprimieren mit Ausnahme der Übergangsphasen immer nur ein VSG zurzeit und wechseln dieses auch *in*

vitro (Mugnier *et al.*, 2016). Als möglicher Bindepartner für die unspezifische Bindung wäre somit das Oberflächenprotein VSG vorstellbar. Ein im nächsten Schritt durchgeführtes Waschen der Zellen vor der Fixierung führte zu keiner Änderung in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern. Es ist daher möglich, dass durch die oberflächlichen Signale intrazelluläre Signale überdeckt werden. Auf Basis der gezeigten Fluoreszenzbilder kann die Hypothese der rezeptorvermittelten Endozytose weder widerlegt noch bestätigt werden.

4.3.4 Pentamidin inhibiert TbAQP2 unmittelbar

Bei der Untersuchung des Inhibitionseffekts von Pentamidin auf TbAQP2 exprimierende Protoplasten durch Song *et al.* (2016) wurde angedeutet, dass der inhibierende Effekt bereits unmittelbar nach Zugabe einsetzte. Es wurde jedoch nicht das Ausmaß der unmittelbaren Inhibition beschrieben. Dies wurde im Folgenden untersucht und mit der Inhibition von TbAQP2 nach zehnminütiger Inkubation verglichen, wie sie für die IC_{50} -Bestimmung in Song *et al.* (2016) eingesetzt wurde. Dazu wurden TbAQP2-Protoplasten mit 2 μ M Pentamidin (als Isethionat in DMSO gelöst) versetzt und unmittelbar oder nach zehnminütiger Inkubation einem isotonen Glycerol-Gradienten (≥ 300 mM) in der *Stopped-Flow*-Apparatur ausgesetzt. In allen Bestimmungen wurden die Protoplasten mit 1 % Ethanol versetzt. Dies ist in einer rationellen Verwendung der Protoplastenpräparationen begründet. Da diese Messungen zusammen mit weiteren Experimenten durchgeführt wurden, konnten durch einheitliche Messbedingungen Kontrollmessungen reduziert werden. Die relative Inhibition von TbAQP2 betrug $(79 \pm 11) \%$ ($n = 2$) nach unmittelbarer Zugabe und $(64 \pm 5) \%$ ($n = 3$) nach zehnminütiger Vorinkubation, wobei jeweils die arithmetischen Mittel \pm S.E.M. angegeben sind (Abb. 4.32, B). Bei der Vermessung direkt nach der Zugabe bedingte das Befüllen der Probenkammer eine Verzögerung von etwa 1 min vor Beginn der ersten Lichtstreuungsmessung. Alle 22 s wurde ein technisches Replikat aufgezeichnet, von denen 6-9 zu einer Messkurve gemittelt und normiert wurden. Bei beiden Bestimmungen war bereits ab dem ersten technischen Replikat ein Hemmeffekt auf die TbAQP2 vermittelte Glycerolpermeabilität zu beobachten, dessen Ausmaß sich bei Messung weiterer technischer Replikate nicht weiter verstärkte. Die gemittelten und normierten Messkurven decken sich im Verlauf mit der nach zehnminütiger Vorinkubation (Abb. 4.32, A). Da der David-Hartley-Pearson-Test auf Normalverteilung erst ab $n = 3$ möglich ist, konnte diese statistische Voraussetzung für die Anwendung eines t-Tests nicht geprüft werden (3.8). Der F-Test ergab jedoch homogene Varianzen im vorliegenden Datensatz ($F = 2,75 < \text{kritischer F-Wert} = 18,51; p = 0,30 > \alpha = 0,05$), sodass diese statistische Voraussetzung erfüllt war. Unter Annahme einer Normalverteilung der Daten ergab ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der TbAQP2-Inhibition nach unmittelbarer Zugabe von Pentamidin und der nach zehnminütiger Inkubation gibt ($t = 2,35 < \text{kritischer t-Wert} = 3,18; p = 0,12 > \alpha = 0,05$).

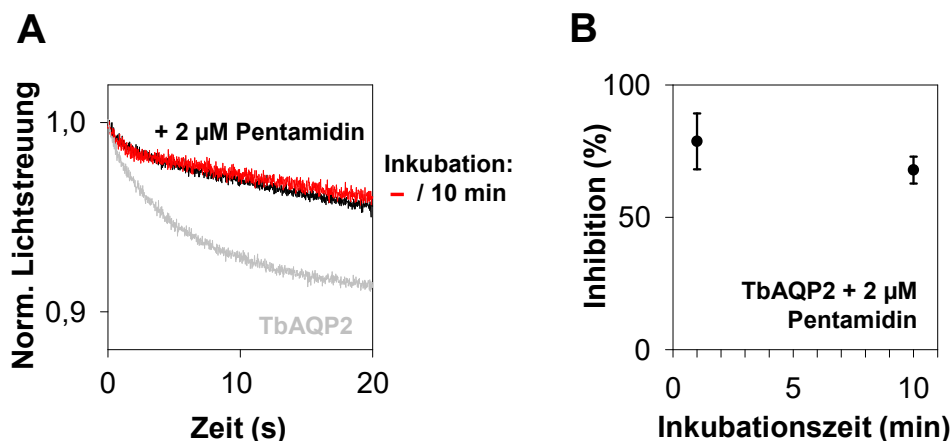


Abb. 4.32 Zeitabhängige Inhibition von TbAQP2 durch Pentamidin. (A) Normalisierte Lichtstreuungskurven von TbAQP2 exprimierenden Protoplasten in einem isotonen Glycerolgradienten (≥ 300 mM) ohne (graue Kurve) und mit 2 µM Pentamidin (in DMSO). Die schwarze Kurve zeigt eine Hemmung der TbAQP2 vermittelten Glycerolpermeabilität nach zehnminütiger Vorinkubation mit Pentamidin. Die rote Kurve wurde unmittelbar nach Zugabe von Pentamidin aufgenommen. Die dargestellten Kurven wurden durch Mittelung von je 6-9 technischen Replikaten erhalten und normalisiert. (B) Die aus den Lichtstreuungskurven abgeleitete relative Inhibition von TbAQP2 durch Pentamidin tritt unmittelbar nach Zugabe zu den Protoplasten ein. Aufgrund der Zeitverzögerung zwischen Zugabe und Messen ist der erste Datenpunkt zu $t = 1$ min aufgetragen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel \pm S.E.M. aus zwei (ohne Vorinkubation) bzw. drei Bestimmungen (10 min Vorinkubation). Die Ethanol-Konzentration betrug in allen Bestimmungen 1 %. Die DMSO-Konzentration bei Pentamidinzugabe war mit 0,05 % vernachlässigbar gering.

Es bestätigte sich, dass Pentamidin die TbAQP2 vermittelte Glycerolpermeabilität unmittelbar hemmt. Für einen Unterschied im Vergleich zu einer zehnminütigen Vorinkubation gab es keine Hinweise. Dies bestätigt auch die schon von Song *et al.* (2016) geäußerte Vermutung, dass aufgrund des rapide eintretenden Effekts die Bindestelle von Pentamidin von der extrazellulären Seite erreichbar ist.

5 Diskussion

Membranproteine (MPs) vermitteln eine Vielfalt an essenziellen Funktionen für eine normale Zellphysiologie. Je nach Aufbau und Lokalisation sind sie an der Zellstruktur, der Signalvermittlung, dem Stoffaustausch und metabolischen Prozessen beteiligt (Tan *et al.*, 2008). In *P. falciparum* und *T. brucei*, den protozoischen Erregern der Malaria beziehungsweise der HAT, sind zwei MPs an der Transmembranlokalisation von Arzneistoffen beteiligt und werden mit deren Resistenz in Verbindung gebracht (Baker *et al.*, 2012; Fidock *et al.*, 2000). Die Anwendung von Chloroquin, dem kostengünstigen, einstigen Mittel der ersten Wahl gegen eine *P. falciparum* Malaria wird durch eine Resistenz limitiert, die mit dem Chloroquin-Resistenz-Transporter (PfCRT) assoziiert wird (Fidock *et al.*, 2000). Der PfCRT ist neben anderen integralen Transportproteinen ein potenzielles Wirkstoffziel in *P. falciparum* (Meier *et al.*, 2018). Die zellfreie Produktion und Reinigung der PfCRT^{3D7}-Isoform, des Wildtyp-Proteins, in Hinblick auf eine Strukturaufklärung wurde als ein Ziel dieser Arbeit formuliert. Eine Struktur könnte als Grundlage für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign dienen. Zusätzlich sollte eine Substanzbibliothek nach PfCRT-Inhibitoren getestet werden. Als drittes Ziel wurde die Untersuchung des kontrovers diskutierten Aufnahmemechanismus von Pentamidin über das trypanosomale Aquaglyceroporin 2 (TbAQP2) formuliert.

5.1 Zur Strukturaufklärung von PfCRT

Obwohl nur etwa 20-30 % der *open reading frames* sequenzierter Genome für MPs kodieren (Wallin & Heijne, 1998), sind integrale und membranassoziierte Proteine die häufigsten Angriffspunkte bekannter Arzneistoffe. Auch das *Plasmodium*-Proteom besteht zu 31 % aus vermutlichen MPs (Gardner *et al.*, 2002). Mehr als 60 % der humanen Wirkstoffziele sind Rezeptoren, membranassoziierte Enzyme, Ionenkanäle, Carrier oder Transporter (Overington *et al.*, 2006; Rask-Andersen *et al.*, 2011). Angesichts ihrer pharmazeutischen und medizinischen Relevanz sind nur verhältnismäßig wenige Strukturen bekannt (Abschnitt 1.3, Abb. 1.4), insbesondere aus Eukaryoten (Bill *et al.*, 2011). Dies spiegelt die technische Herausforderung an die Strukturaufklärung von MPs wider, welche aufgrund ihrer Hydrophobizität, ihrer Instabilität außerhalb einer Membrenumgebung und aufgrund ihrer meist geringen Konzentration in ihren natürlichen Geweben beziehungsweise der Schwierigkeiten bei einer Überexprimierung besteht (Bowie, 2001; Bernaudat *et al.*, 2011).

5.1.1 Eignet sich zellfreies PfCRT für eine Strukturaufklärung?

Diese Arbeit stellt ein reproduzierbares, robustes und effizientes CF-System zur Produktion des PfCRT mit hoher Ausbeute vor. Es ergänzt damit bestehende Möglichkeiten, rekombinanten PfCRT für Struktur- und Funktionsstudien zu erhalten. Dieser wurde bisher nur in einer Vielzahl von zellbasierten Expressionssystemen produziert: *X. laevis* (z.B. Bakouh

et al., 2017; Martin *et al.*, 2009; Summers *et al.*, 2014), *E. coli* (Juge *et al.*, 2015), *P. pastoris* (Paguio *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002) und *S. cerevisiae* (Baro *et al.*, 2011; Callaghan *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002), *S. frugiperda* (Wright *et al.*, 2018), *Dictyostelium discoideum* (Naudé *et al.*, 2005) und HEK-Zellen (Kim *et al.*, 2019; Reeves *et al.*, 2006). Für die Strukturanalyse der 7G8-Isoform wurde diese von Kim *et al.* (2019) in HEK298-Zellen produziert. Dabei wurde die BacMam-Technologie angewandt, bei der in Sf9-Insektenzellen produzierte Baculoviren zur Transduktion von Säugetierzellen eingesetzt werden (Dukkipati *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu diesen aufwändigen Transfektionsschritten benötigt das zellfreie Produktionssystem lediglich eine ausreichende Menge an kodierender *template*-DNA, die in dieser Arbeit mit Hilfe eines Kits für eine Maxipräparation leicht erhalten und für mehrere Zellfreieproduktion eingesetzt werden konnte.

Der hohe AT-Gehalts des *Plasmodium*-Genoms (80,6 %, Gardner *et al.*, 2002) stellte in einigen Systemen ein Hindernis bei der rekombinanten Produktion von PfCRT dar. Dies wurde zum Beispiel bei Verwendung von Hefen und *X. laevis* berichtet und erforderte eine Codonoptimierung (Martin *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde aufgrund der Verwendung der Translationsmaschinerie und der tRNA und aus *E. coli* vorbeugend eine an das *codon usage* von *E. coli* optimierte DNA verwendet. Um eine Lokalisation in der Zellmembran zu gewährleisten, mussten in *X. laevis* potenzielle *trafficking*-Motive aus den Termini des PfCRT entfernt werden (Martin *et al.*, 2009). Mit Ausnahme der Einführung eines His₁₀-tags für eine IMAC war eine Modifikation von PfCRT für das CF-System nicht notwendig. Durch die kotranslationale Solubilisation mit Brij® 78 entfiel eine Isolation aus einem membranhaltigen System, in welchen alphahelikale MPs bevorzugt exprimiert werden (Wagner *et al.*, 2006). Dies stellte somit eine Vereinfachung des Arbeitsprozesses im Vergleich zu zellbasierten Systemen dar (Vgl. Abschnitt 1.3, Abb. 1.5).

Für strukturelle Studien wurden zellfreie Proteine bisher hauptsächlich mittels NMR-Spektroskopie und der röntgendiffraktometrischen Analyse von Kristallen untersucht (Bernhard & Tozawa, 2013). Eine Anwendung für eine Kryo-EM wurde auch schon berichtet (Novikova *et al.*, 2018). Diese Arbeit zeigt das Potenzial des CF-Systems für die Strukturanalyse eines plasmodialen MPs. Die zellfreie Produktion von PfCRT führte zum Erhalt reproduzierbarer Mengen von durchschnittlich 1,5 mg affinitätsgereinigtem Protein pro ml *reaction mixture* (RM). Die produzierte Menge konnte durch die parallele Inkubation mehrerer Reaktionsansätze mit wenig Aufwand gesteigert werden. Eine S30-Extrakt-Charge mit einer theoretischen Ausbeute von 10 ml Extrakt aus 5 l *E.-coli*-Kultur entspräche etwa 30 mg zellfreiem Protein bei einer angenommenen Ausbeute von 1 mg pro ml RM. Die Quantitätshürde im Strukturaufklärungsprozess wurde mit der zellfreien Produktion folglich zeitgünstig bewältigt.

Milde Detergenzien, Salze und Glycerol erhöhen die Effektivität der Affinitätsreinigung

Nach den allgemeinen Empfehlungen für eine Probenvorbereitung (Gräslund *et al.*, 2008), denen auch Kim *et al.* (2019) gefolgt sind, wurde zellfreies PfCRT mittels IMAC und SEC gereinigt. Dabei traten für MPs typische Probleme hinsichtlich der Solubilisierung und Stabilität in den verwendeten Detergenzien auf. Die Pufferkomposition für die IMAC wurde bei Verwendung von DDM als Beispiel-Detergens optimiert. Durch die Erhöhung des Salzgehaltes oder durch den Zusatz von Glycerol zum TRIS-Puffer wurde das zuvor aufgetretene Problem behoben, dass das Zielprotein größtenteils auf der Matrix verblieb. Als Ursache für die zuvor ungenügende Reinigungseffektivität wurden unspezifische Bindungen evaluiert. Schließlich konnte die Proteinausbeute in den Elutionsfraktionen in den mg-Bereich gesteigert werden, sodass ausreichende Mengen PfCRT für eine Strukturaufklärung erhalten wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die Solubilisationsfähigkeit eines Detergens nur in Kombination mit dem verwendeten Puffer bewerten lässt.

Obwohl sich keine allgemeinen Vorhersagen zu der Eignung eines Detergens für die Solubilisierung eines MPs vornehmen lassen, ergab die Testung verschiedener Detergenzien für die IMAC von PfCRT eine klare Aufteilung in zwei Gruppen. Die geeigneten Detergenzien sind insgesamt aufgrund ihrer chemischen Struktur nach Privé (2007) als eher mild zu klassifizieren (siehe Abschnitt 4.1.3). Eine ungenügende Solubilisierung wurde trotz angepasster Pufferzusammensetzung für harsche Detergenzien beobachtet. Das milde Detergens LMNG stach hervor, da es bereits bei einfacher CMC und minimaler NaCl-Konzentration im Puffer zu einer Wiederfindung von PfCRT in den Elutionsfraktionen der IMAC führte. Die SEC-Chromatogramme indizierten eine höhere Probenhomogenität für die mit LMNG und Brij® 78 solubilisierten PfCRT-Proben. Für eine Strukturanalyse wurde PfCRT jedoch nicht ausreichend von LMNG stabilisiert. Eine Langzeitstabilität von PfCRT in Brij® 78 wurde hingegen über sieben Tage gezeigt. Im Gegensatz zu LMNG waren zudem leere Mizellen bei der Solubilisierung mit Brij® 78 kein Störfaktor bei der TEM. Auf Basis der gezeigten Ergebnisse kann daher eine Empfehlung ausgesprochen werden, Brij® 78 nicht nur bei der Wahl eines Detergens für die zellfreie Produktion von MPs zu berücksichtigen, sondern auch für eine Solubilisation während einer Reinigung und Elektronenmikroskopie.

Eine Membranisolation und Affinitätsreinigung von PfCRT mit Detergenzien ist von PfCRT aus HEK-Zellen, Insektenzellen, *E. coli* und *P. pastoris* beschrieben (Tab. 5.1). Als vorherrschende Detergenzien wurden die nichtionischen, maltosidischen Detergenzien DDM und DM verwendet. Wright *et al.* (2018) und Kim *et al.* (2019) verwendeten jeweils eine Kombination aus DDM und Cholesterolemisuccinat (CHS) (10:1). Für das Cholesterol imitierende CHS ist eine konzentrationsabhängige Thermostabilisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren beschrieben (Thompson *et al.*, 2011). Zusätzlich können bei der Membranisolation von MPs aus Zellsystemen verbleibende Lipide eine stabilisierende Wirkung ausüben (Privé, 2007).

Viele in der Literatur beschriebene Puffer enthalten recht hohe Salzgehalte (200-500 mM NaCl), Glycerol (10-20 %), Proteaseinhibitoren und/oder reduzierende Substanzen. Die Zusätze sind als stabilitätsfördernd zu bewerten. Auch eine Auswirkung auf die Qualität des Reinigungsergebnisses ist zu erwarten. Die Zusätze lassen folglich vermuten, dass in dieser Hinsicht Schwierigkeiten auftraten, wobei mit Ausnahme von Wright *et al.* (2018) solche nicht explizit in der Literatur beschrieben sind. Wright *et al.* (2018) erwähnen eine proteolytische Degradation und wählten in einer *large-scale*-Reinigung eine PfCRT-Variante mit trunkierten Termini aus, die sich in der SDS-PAGE vermeintlich weniger anfällig gegenüber einer proteolytischen Degradation zeigte. Auf eine Degradation hindeutende Fragmente wurden in der SDS-PAGE von zellfreiem PfCRT nicht beobachtet. Der Puffer von Juge *et al.* (2015) weicht mit einem niedrigen Salzgehalt (100 mM NaCl) und der Verwendung von β -OG als eher harsch zu klassifizierendes Detergens von den anderen Puffern ab. Diese Abweichung könnte in der von ihnen vorgenommenen Modifikation des PfCRTs liegen, welche das Verhalten bei der Solubilisation möglicherweise verändert hat. Sie produzierten ein PfCRT, das N- und C-terminal mit den ersten 120 Aminosäuren eines löslichen *E. coli* Proteins unbekannter Funktion (YbeL, Leviatan *et al.*, 2010) fusioniert war.

Tab. 5.1 Übersicht über in der Literatur verwendete Detergenzien und Puffer für eine Affinitätsreinigung von PfCRT.

Referenz	Organismus	Detergens	Puffer
Diese Arbeit	Zellfrei	0,05 % Brij® 78	20 mM TRIS (pH 7,4), 500 mM NaCl, 2 mM DTT
Kim <i>et al.</i> (2019)	HEK	0,05 % DDM, 0,005 % CHS	20 mM HEPES (pH 7,5), 200 mM NaCl
Wright <i>et al.</i> (2018)*	Sf9	0,03 % DDM, 0,003 % CHS	100 mM TRIS (pH 7,5), 500 mM NaCl, 10 % Glycerol
Tan <i>et al.</i> (2006)	<i>P. pastoris</i>	0,1 % DDM	50 mM TRIS-HCl (pH 7,4) 10 % Glycerol, Proteaseinhibitoren
Lekostaj <i>et al.</i> (2008)	<i>P. pastoris</i>	1 % DM	50 mM TRIS-HCl (pH, 7,5), 500 mM NaCl, 250 mM Saccharose, 20 % Glycerol, 1 mM MgCl ₂
Paguio <i>et al.</i> (2009)	<i>P. pastoris</i>	0,5 % DM	50 mM TRIS (pH, 7,5), 500 mM NaCl, 250 mM Saccharose, 20 % Glycerol, 1 mM MgCl ₂ , 6,5 mM β -Mercaptoethanol, Protease-Inhibitoren
Zhang <i>et al.</i> (2002)	<i>P. pastoris</i>	0,1 % DM	50 mM TRIS-HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl, 250 mM Saccharose, 20 % Glycerol, 1 mM MgCl ₂ , 6,5 mM DTT
Juge <i>et al.</i> (2015)**	<i>E. coli</i>	1 % β -OG	20 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 10 mM KCl

Bemerkung: * Reinigung von PfCRT Δ 2-50 Δ 406-424, ** Reinigung von YbeL-PfCRT-YbeL

Qualitätsindizien: GFP-Fluoreszenz und Dimerisierung

Wie kann die Qualität des produzierten PfCRT bewertet werden? Optimalerweise wird diese über die Funktion eines rekombinanten Proteins nachgewiesen. Dieser Nachweis steht für den zellfreien PfCRT noch aus. Dennoch konnten bereits Surrogatnachweise für die Qualität in dieser Arbeit dargelegt werden. Ein Indiz bezieht sich auf die Faltung. Die Stabilität und Funktion von Proteinen sind eng mit ihrer Faltung verknüpft, wie pathologische Effekte missgefalteter Proteine zeigen (Dobson, 2003). Als Faltungsindikator wurde ein an den C-Terminus von PfCRT fusioniertes GFP eingesetzt. Die Fusion mit GFP ist in zellfreien wie zellbasierten Systemen eine etablierte Qualitätskontrolle (Drew *et al.*, 2006; Geertsma *et al.*, 2008; Müller-Lucks *et al.*, 2012). Erst bei entsprechender GFP-Koformation bildet sich aus drei benachbarten Aminosäureresten (Ser65-Tyr66-Gly67) posttranslational durch Zyklisierung und Oxidation autokatalytisch der Fluorophor mit einer *p*-Hydroxybenzylidenimidazolidinon-Struktur aus (Cody *et al.*, 1993; Heim *et al.*, 1994) (Abb. 5.1, B). Da ein Protein bei der Translation vom N- zum C-Terminus aufgebaut wird, indiziert eine Fluoreszenz eines C-terminalen GFPs auch eine native Faltung des N-terminalen Proteins (Waldo *et al.*, 1999). Zusätzlich schützt die Einbettung in eine fassartige Beta-Faltblattstruktur diesen vermutlich vor Solventeffekten und trägt damit zu der fluoreszierenden Eigenschaft des GFPs bei (Ormö *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996) (Abb. 5.1, A). Folglich wird bei Fehlfaltung oder einer Denaturierung keine Fluoreszenz beobachtet.

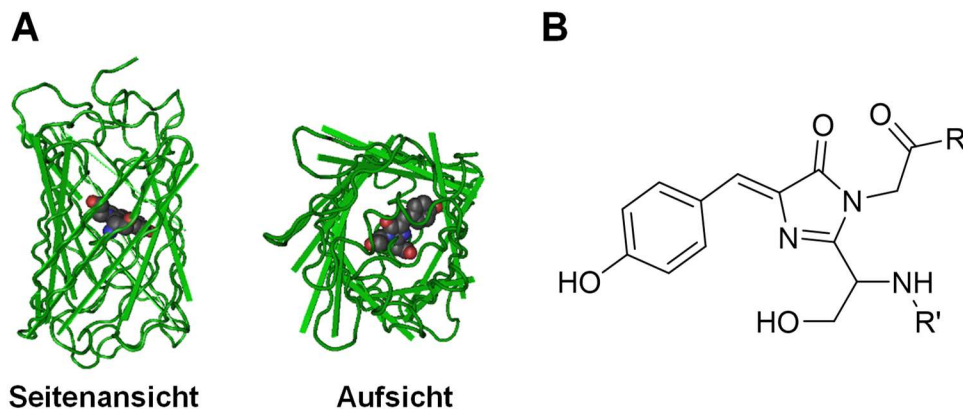


Abb. 5.1 Das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* und sein Fluorophor. (A) Der Fluorophor ist raumfüllend im Inneren der Beta-Faltblatt-Struktur des GFPs (PDB #1GFL) gezeigt. Die Darstellung wurde mit *Cn3D* erstellt. (B) Struktur des Fluorophors, welcher sich autokatalytisch bei richtiger Faltung aus den Aminosäureresten Ser65-Tyr66-Gly67 bildet. R, R' = Reste.

Es wurde bestätigt, dass mit dem Detergens Brij® 78 der PfCRT nicht nur erfolgreich zellfrei produziert werden kann, sondern auch fluoreszierende GFP-Fusionsproteine erhalten werden. In dieser Arbeit und in Vorarbeiten (Petersen, 2017) wurde insgesamt der Einfluss von acht Detergenzien auf die Faltung und die Ausbeute von zellfreiem PfCRT als GFP-Fusionsprotein

untersucht. Mit Ausnahme von Brij® 78 und Brij® 58 wurde bei Verwendung anderer Detergenzien für die zellfreie Reaktion entweder kein PfCRT-GFPΔM1 im Western Blot nachgewiesen oder keine Fluoreszenz trotz einer Bande im Western Blot beobachtet. Dies weist auf keine beziehungsweise eine vermutlich fehlgefaltete Proteinproduktion hin. In Vorarbeiten führte Brij® 78 im Vergleich zu Brij® 58 zu einem günstigeren Verhältnis zwischen fluoreszierender und nicht fluoreszierender Proteinbande im Western Blot bei gleichzeitiger etwa vierfach höherer Fluoreszenzintensität. Der Anteil der im SDS-PAGE-Gel fluoreszierenden Proteinbande an der im Western Blot beobachteten Doppelbande betrug mit Brij® 78 je nach verwendetem Antikörper 50-75 % (Petersen, 2017). Das heißt, dass auch mit Brij® 78 anteilig vermutlich fehlgefaltetes Protein erhalten wird. Dieses Migrationsverhalten in zwei Faltungsformen wurde in dieser Arbeit zusätzlich zur SDS-PAGE bei der SEC von PfCRT-GFPΔM1 beobachtet. Die Detektion bei zwei verschiedenen Absorptionswellenlängen bestätigte den vorherigen Befund. Die chromatographische Trennung ermöglicht die gewünschte Faltungsform anzureichern. Kim *et al.* (2019) nutzten ebenfalls die Vorteile eines GFP-Fusionsproteins in der frühen Phase des Produktionsprozesses, um in einem initialen Expressionsscreening von 12 CRT-Varianten die 7G8-Variante hinsichtlich der besten Monodispersität und Ausbeute zu selektieren.

Die Kryo-EM-Struktur von PfCRT^{7G8} von Kim *et al.* (2019) zeigt ein Monomer mit einem Durchmesser von 5,6 nm. Ähnlich große Partikel (≈ 6 nm) wurden auch für Monomere von zellfreiem PfCRT in TEM-Aufnahmen beobachtet. Der beinahe vollständige Ausschluss von PfCRT durch einen 100-kDa-Filter sowie insbesondere die TEM-Aufnahmen von in Brij® 78 solubilisiertem PfCRT indizieren eine Dimerisierung des zellfreien PfCRT. Bei Mutagenese des postulierten Dimerisierungsmotives wurde kein verändertes Verhalten in der SDS-PAGE beobachtet. Die Substitution gegen voluminösere Aminosäurereste stützte sich jedoch nur auf eine bioinformatische Vorhersage (Martin & Kirk, 2004). Die Beobachtung SDS-resistenter Oligomere könnte ein Artefakt durch Migration eines hydrophoben MPs sein. Dass das zellfreie System grundsätzlich in der Lage ist, korrekt gefaltete, zur Oligomerisierung befähigte plasmidiale MPs zu produzieren, wird durch folgende zwei Beispiele deutlich. Der in demselben CF- System wie PfCRT produzierte und gereinigte Hexosetransporter PfHT1 zeigt in der SDS-PAGE ein ähnliches Verhalten wie PfCRT. Im Coomassie®-Brillant-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gel wird eine Proteinleiter beobachtet. Ein Anti-Penta-His-Antikörper erkannte ein Monomer und ein Dimer (Abb. 5.2). Die von Qureshi *et al.* (2020) veröffentlichte Kristallstruktur bestätigt, dass PfHT1 Homodimere bildet.

Der zellfrei produzierte plasmidiale Formiat-Nitrit-Transporter migriert in der SDS-PAGE als Oligomer und zeigt die für diese Proteinfamilie typische Pentamer-Struktur in TEM-Aufnahmen (Helmstetter *et al.*, 2019). Zellfrei produziertes PfFNT ist zudem in seiner Qualität vergleichbar mit hefebasiertem Protein (Hajek *et al.*, 2019).

Die Bildung von Oligomeren ist von der Faltung abhängig (Jaehme & Michel, 2013). Christis *et al.* (2008) bezeichnen die Oligomerisierung sogar als im Wesentlichen eine Erweiterung der Proteinfaltung.

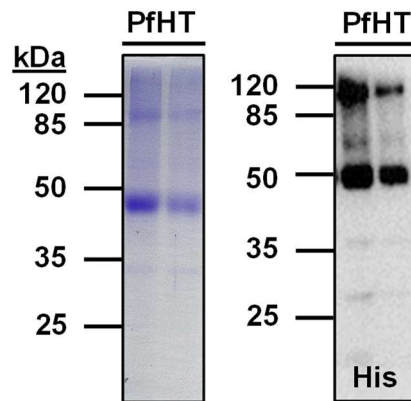


Abb. 5.2 Dimere von zellfrei produziertem PfHT1 in der SDS-PAGE. In Zusammenarbeit mit P. Hajek wurde der *P. falciparum* Hexosetransporter als PfHT1-His₁₀ (59 kDa) mit demselben zellfreien System wie PfCRT produziert und an Ni²⁺-NTA gereinigt. Die Coomassie®-Brillant-Blau-Färbung zeigt eine Proteinleiter, im Western Blot unter Verwendung eines Anti-Penta-His-Primärantikörpers wurde PfHT als Monomer und Dimer detektiert (Belichtung: 7 s, Lumi ImagerTM F1).

PfCRT-Dimere sind selten in der Literatur beschrieben. Lekostaj *et al.* (2008) weisen auf eine schwache Dimer-Bande in einem Western Blot von PfCRT aus *P. pastoris* hin. Diese beobachteten sie für PfCRT^{Dd2}, jedoch nicht für den Wildtyp PfCRT^{HB3}. Zur Absicherung der Dimerisierung des zellfreien PfCRT sollte diese mit ergänzenden Methoden untersucht werden. Techniken zur Identifizierung von Protein-Eigenassoziationen nutzen neben dem Migrationsverhalten in der SEC und der Elektrophorese zum Beispiel die Sedimentation bei Ultrazentrifugation, eine chemische Quervernetzung mit Aldehyd-Reagenzien oder die Veränderung von Lichtstreuungs- oder Fluoreszenzintensitäten (z.B. FRET, Förster-Resonanz-Energie-Transfer) (Gell *et al.*, 2012).

5.1.2 Kryo-EM: Ein neuer Ansatz für die Strukturaufklärung von PfCRT

Die Beobachtung von SDS-resistenten Dimeren bietet die Möglichkeit, einen neuen elektronenmikroskopischen Strukturaufklärungsansatz zu verfolgen. Die Berichte über hochaufgelöste Strukturen < 100 kDa nehmen aufgrund technologischer Fortschritte bei der Detektion und Bildanalyse zu, wie zum Beispiel die Strukturen der Isocitrat-Dehydrogenase (93 kDa; 3,8 Å; Merk *et al.*, 2016), der Alkohol-Dehydrogenase (82 kDa; 2,7 Å; Herzik *et al.*, 2019), von Hämoglobin (64 kDa; 3,2 Å; Khoshouei *et al.*, 2017) und Streptavidin (52 kDa; 3,2 Å; Fan *et al.*, 2019) belegen. Partikel < 100 kDa und der Erhalt hoher Auflösungen < 2 Å gelten dennoch als technisch äußerst anspruchsvoll (Kühlbrandt, 2014a) und die genannten Beispiele sind angesichts der Tatsache, dass etwa 99 % aller Einzel-Partikel-Kryo-EM-

Strukturen mit einer Auflösung < 4 Å Makromoleküle > 200 kDa darstellen (Herzik *et al.*, 2019), eher als Ausnahme zu betrachten.

Es gibt Möglichkeiten, eine Partikelgröße durch die Fusion mit Antikörpern oder Antikörperfragmenten zu manipulieren (Nygaard *et al.*, 2020). Kim *et al.* (2019) adressierten diese Größenhürde durch die Bindung eines Fab-Fragments an das 49 kDa schwere PfCRT^{7G8}, wodurch ein etwa 103 kDa schwerer Komplex erhalten wurde. Ein Dimer von zellfreiem PfCRT-His₁₀ würde ebenfalls die kritische Größengrenze für die Strukturanalyse mittels Kryo-EM überschreiten. Diese Methode lässt zudem aufgrund der computergestützten Sortierung der Partikel in Klassensummen ein gewisses Maß an Heterogenität der Probe zu, welche eine Kristallisation verhindern würde (Cheng, 2015). Der Einsatz von Detergenzien ist nicht nur in der Kristallographie, sondern auch in der TEM und Kryo-EM von MPs anspruchsvoll. Freie Mizellen sowie weitere Pufferkomponenten können zu einem hohen Hintergrundsignal führen und bergen das Risiko, mit der Proteinprobe verwechselt zu werden (Gewering *et al.*, 2018). Eine technische Lösung bietet die neue Methode *GraDeR*, eine Glycerolgradientenzentrifugation zur Entfernung freier Mizellen (Hauer *et al.*, 2015). Eine vielversprechende Methode ist auch die ko- oder posttranslationale Rekonstitution von zellfreien MPs in sogenannte Nanodiscs (Bernhard & Tozawa, 2013). Nanodiscs sind ein scheibenförmiges Modell-Membransystem, welches aus einem mit einer Lipiddoppelschicht gefüllten, amphiphilen Gürtel besteht. Letzterer kann aus zwei Kopien eines helikalen *membrane-scaffold*-Proteins (MSP) aufgebaut sein (Bayburt *et al.*, 2002), welches den Durchmesser der Nanodiscs bestimmt (Denisov *et al.*, 2004). C. Hansen (Pharmazeutisches Institut, CAU, Kiel) hat gezeigt, dass zellfreies PfCRT-GFPΔM1 kotranslational in solche eingebaut wird und die Produktion ähnlich effektiv wie bei Verwendung von Brij® 78 ist. Bermerkenswert ist, dass die Nanodiscs zu einer Verschiebung der Intensitäten in der charakteristischen Monomer-Doppelbande zu Gunsten der fluoreszierenden, unteren Proteinbande im Western Blot führte (Abb. 5.3). Der Einsatz von Nanodiscs bedeutete folglich eine Qualitätssteigerung.

Kim *et al.* (2019) nutzten ebenfalls die Nanodisc-Technologie. Sie rekonstituierten PfCRT^{7G8} als Fab-Komplex posttranslational in POPG-MSP1D1-Nanodiscs. Das von C. Hansen verwendete MSP1E3D1 (Ø 12,1 nm) weist einen größeren Durchmesser auf als das von Kim *et al.* (2019) verwendete MSP1D1 (Ø 9,7 nm) (Ritchie *et al.*, 2009). Ob ein größerer Durchmesser die Inkorporation von PfCRT-Dimeren ermöglicht, wäre zu untersuchen. Eine parallele Testung verschiedener Bedingungen wäre angesichts der Flexibilität des zellfreien Systems einfach umsetzbar. Mit ihrem Erfolg bestätigen Kim *et al.* (2019), dass eine elektronenmikroskopische Methode ein zukunftsweisender Ansatz für die Strukturanalyse schwer zu kristallisierender MPs ist.

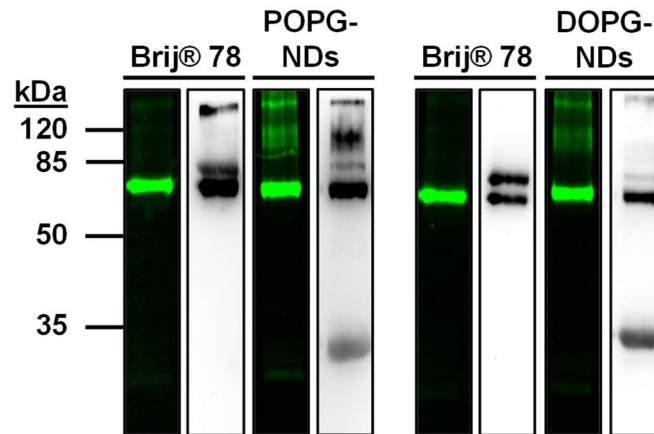


Abb. 5.3 Qualitätsvergleich von PfCRT als GFP Δ M1-Fusionsprotein bei kotranslationaler Verwendung von Brij® 78 (0,8%) oder von Nanodiscs (je 30 μ M) für die zellfreie Produktion (Hansen, 2019). Gezeigt sind jeweils die Fluoreszenz im SDS-PAGE-Gel (Belichtung: 2 s) sowie der dazugehörige Western Blot bei Verwendung eines primären Anti-Penta-His-Antikörpers (Belichtung: 10 min). Die Belichtung und Dokumentation erfolgte mit dem *ChemoStar ECL & Fluorescence Imager*. Die Western-Blot-Bande bei etwa 33 kDa entspricht dem MSP1E3D1-Protein der Nanodiscs. POPG und DOPG sind die Abkürzungen für die verwendeten Lipide bei der Assemblierung der Nanodiscs. Im Vergleich zu dem Detergens wurden mit den Nanodiscs ein höherer Anteil der fluoreszierenden, unteren Bande in der charakteristischen Doppelbande (um 85 kDa) für PfCRT-GFP Δ M1 erhalten.

5.1.3 Zellfreies Protein für Funktionsstudien

Im Jahr 2020 wurde die physiologische Funktion von PfCRT als Transporter einer Reihe von Peptiden beschrieben. Dabei konnten Shafik *et al.* (2020) bei der Charakterisierung des Peptids VF-6 (VDPVNF) nur einen Transport aus dem Zytosol von *X. laevis* Oozyten messen, nicht jedoch eine Aufnahme aus dem Medium. Angesichts der angenommenen Topologie in *X. laevis* Oozyten entspricht die gemessene Transportrichtung einem Import in die Verdauungsvakuole. Zusätzlich zur Modifikation des PfCRTs, welche nötig ist, um eine Lokalisation in der Plasmamembran der Oozyten möglich zu machen (Vgl. Martin *et al.*, 2009), wird von einer Beeinflussung des Transports von den N- und C-terminalen Epitop-tags berichtet (Shafik *et al.*, 2020). Auch gibt es Beispiele für die Beeinflussung endogener Transporter des Expressionssystems, so soll der PfCRT in *X. laevis* einen höheren zytosolischen pH-Wert und ein niedrigeres Membranpotential im Vergleich zu Kontrollloozyten vermitteln (Nessler *et al.*, 2004). Ein mögliche Modulation der Funktion über die Termini zeigt sich des Weiteren daran, dass bei N- und C-terminaler Fusion eines uncharakterisierten Proteins aus *E. coli* in Proteoliposomen rekonstituiertes PfCRT den Transport eines breiten Spektrums organischer Kationen vermittelte (Juge *et al.*, 2015). Auch Chlorid- (Zhang *et al.*, 2002) und Eisen-Ionen (Bakouh *et al.*, 2017) wurden als Substrate von rekombinantem PfCRT vorgeschlagen. Angesichts dieser Inkonsistenz in den Funktionsstudien werden mehr Studien in weniger komplexen Messsystemen mit einer einfachen Ermittlung der Proteinorientierung und einer leichten Manipulation der Experimentbedingungen benötigt (Roepe, 2011).

Die in dieser Arbeit vorgestellte zellfreie Produktion führt in kurzer Zeit zum Erhalt großer Mengen an gereinigtem PfCRT, welche mit Ausnahme eines Epitop-tags, welcher nachträglich proteolytisch entfernt werden kann, keine Modifikation der Primärsequenz erfordert. Dies kann bei Rekonstitution in künstliche Vesikel die Forderung nach weniger komplexen Funktionsstudien erfüllen.

5.2 Der Phänotyp von PfCRT exprimierenden *S. cerevisiae* für eine Inhibitorfindung

Die Ansätze zur Findung neuer Zielstrukturen im Rahmen der *drug discovery* werden in *target*-basierte und in systembasierte Ansätze unterteilt (Eder *et al.*, 2014). Ein *target*-basierter Ansatz wird durch die Strukturaufklärung potenzieller Zielstrukturen gefördert, aber auch durch die systematische Testung von Substanzbibliotheken. In dieser Arbeit wurden ein *target*-basierter Ansatz mit einem phänotypischen *read-out* kombiniert, um eine Substanzbibliothek mit bekannten antiplasmodialen Eigenschaften nach ihrem PfCRT^{3D7}-Inhibitions Potenzial zu testen. Um die Parameter für den Testassay zu ermitteln, wurde zuvor der Transport von CQ über PfCRT-Isoformen in *S. cerevisiae* untersucht.

5.2.1 PfCRT-Isoformen vermitteln einen CQ-Influx in *S. cerevisiae*

Eine verminderte bis ausbleibende Trübung von Hefesuspensionen, die in einem 100-*well*-Plattenformat in Anwesenheit verschiedener CQ-Konzentrationen kultiviert wurden, zeigte einen CQ-Influx in *S. cerevisiae* an. Im Vergleich zur Leerplasmid-Kontrolle waren die PfCRT-exprimierenden Hefen bis zu 12-fach empfindlicher gegenüber der Anwesenheit von CQ im Kulturmedium. Der von Baro *et al.* (2013) und Baro *et al.* (2011) beobachtete zytotoxische Effekt von CQ auf das Hefewachstum wurde bestätigt. Während der von Baro *et al.* genutzte Hefestamm CH1305 in Anwesenheit von bis zu 150 mM CQ noch ein Kolonie-Wachstum zeigte, zeigte die Leerplasmid-Kontrolle des W303-1A-Stammes in dieser Arbeit ab 25-50 mM CQ eine verminderte Trübung der Flüssigkultur. In Experimenten zur Stressresistenz von *S. cerevisiae* zeigte sich der Laborstamm W303-1A als empfindlich gegenüber oxidativen Stress (Avrahami-Moyal *et al.*, 2012; Mejía-Barajas *et al.*, 2017). Da eine CQ-Behandlung von *S. cerevisiae* zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies führt und somit oxidativen Stress auslöst (Baranwal *et al.*, 2014), bietet dies eine Erklärung für die stärkere Wachstumsbeeinträchtigung des W303-1A-Stammes durch CQ.

Für die aus einer CQS-Parasitenlinie stammenden PfCRT^{3D7}-Isoform, deren K76T-Mutante sowie der mit einer CQ-Resistenz assoziierten Isoform PfCRT^{Dd2} wurden IC₅₀-Werte anhand ihres Einflusses auf das Hefewachstum in Anwesenheit von CQ im Medium bestimmt. Die ermittelten IC₅₀-Werte liegen im niedrigen millimolaren Bereich. Eine Akkumulation von CQ zu internen millimolaren Konzentrationen in der Verdauungsvakuole von *P. falciparum* wurde

beschrieben (Geary *et al.*, 1986; Yayon *et al.*, 1984). Vor diesem Hintergrund könnten die millimolaren Test-Konzentrationen von physiologischer Relevanz sein, welche durch die Verwendung eines sauren Kulturmediums (pH 5,6) verstärkt wird. Die bestimmten IC₅₀-Werte deuteten an, dass die mit einer Chloroquinresistenz assoziierte PfCRT^{Dd2}-Variante zu einem verstärkten CQ-Influx im Vergleich zum Wildtyp führte. Baro *et al.* (2011) beobachteten einen solchen Unterschied zwischen den PfCRT-Isoformen erst nach Erhöhung des pH-Wertes von pH 5,0 auf pH 6,75. Der Unterschied zwischen den von Baro *et al.* (2013) bestimmten Wachstumsverzögerungen nach Induktion der PfCRT-Isoformen in Anwesenheit von 16 mM CQ entspricht einem Faktor 1,5-2,2. Der Faktor zwischen den in dieser Arbeit ermittelten IC₅₀-Werten von PfCRT^{3D7} und PfCRT^{Dd2} beträgt 1,4-2,2. Aufgrund der konstitutiven Expression und der Verwendung der AUC als Parameter für das Wachstum ist ein direkter Vergleich zu Baro *et al.* (2013) jedoch nur eingeschränkt möglich. Zur Bestätigung des in dieser Arbeit gezeigten Unterschieds zwischen den Isoformen sollte noch ein Nachweis der Expressionslevel an der Plasmamembran erfolgen. Generell untermauert dieser Unterschied die Annahme zum Resistenzmechanismus, dass die Erniedrigung der CQ-Konzentration in der plasmodialen Verdauungsvakuole durch einen verstärkten Transport von CQ über einen mutierten PfCRT vermittelt wird (Fidock *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2009; Martin & Kirk, 2004).

In *X. laevis* Oozyten wird für den Wildtyp erst durch die Kombination mehrerer Mutationen, die auch in CQR-Varianten vorhanden sind, eine zur Negativkontrolle höhere [³H]-CQ-Aufnahme gemessen (Summers *et al.*, 2014). Die Topologie wird wie in *S. cerevisiae* mit zytosolischen Termini angenommen, sodass analog eine zytosolische Aufnahme einem Export aus der parasitären Verdauungsvakuole entspricht. Reeves *et al.* (2006) maßen die Akkumulation von [³H]-CQ in HEK-Zellen. Sowohl der Wildtyp als auch die Dd2-Isoform unterschieden sich nicht von der Leerplasmidkontrolle. CQ-Effluxexperimente an Plasmodien kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Krogstad *et al.* (1987) berichteten zuerst einen 40-50-fachen Unterschied zwischen CQR- und CQS-Parasiten in Hinblick auf die Zeit, die benötigt wird, um 50 % des akkumulierten CQ freizusetzen. Die Arbeitsgruppe um Bray *et al.* (1992) stellte erst einen ähnlich schnellen Effluxphänotyp sowohl für CQS- wie für CQR-Parasitenlinien fest, bevor sie einen Waschschrift im Experimentaufbau als wesentlich für eine Reproduktion der Ergebnisse von Krogstad *et al.* (1987) identifizierten (Bray *et al.*, 2006). *Trans*-stimulierte Effluxexperimente von Sanchez *et al.* (2007), welche ebenfalls einen Waschschrift inkludierten, zeigten einen Faktor von etwa 6 zwischen der Effluxrate von Dd2-Parasiten (CQR) und der von HB3-Parasiten (CQS). Sie schlussfolgern das sowohl CQS- als auch CQR-Parasiten einen Carrier für CQ besitzen, die sich in ihrer Kinetik unterscheiden (Sanchez *et al.*, 2007). Kim *et al.* (2019) berichten konform dazu eine geringe Aufnahme von [³H]-CQ über PfCRT^{3D7} in Proteoliposomen und eine dazu etwa 6-fach höhere Aufnahme über PfCRT^{Dd2}. Die in Nanodiscs rekonstituierten Proteine zeigten ähnlich hohe Affinitäten (Dissoziations-

konstante $K_d < 0,3 \mu\text{M}$). In der Struktur von PfCRT^{7G8} (CQR) zeigen Kim *et al.* (2019) eine potenzielle Bindetasche mit negativerer Oberflächenelektrostatik als der Wildtyp. Daraus lässt sich eine Anziehung positiv geladener Substrate ableiten (Kim *et al.*, 2019). Die Untersuchung an rekombinanten PfCRT-Isoformen und an Plasmodienkulturen führten folglich teils zu kontroversen Ergebnissen. Es gibt genügend Hinweise in der Literatur, dass auch der Wildtyp zum CQ-Transport befähigt ist. Dies bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit. Die Frage nach dem Mechanismus, wie CQ über den Wildtyp-Transporter und die mit einer CQ-Resistenz assoziierten Isoformen transportiert wird, bleibt jedoch noch offen und stellt einen Ausgangspunkt für zukünftige Studien am PfCRT dar.

In dieser Arbeit war die K76T-Mutante mit Ausnahme einer verlängerten Generationszeit in Hinblick auf ihren CQ-abhängigen Effekt auf das Hefewachstum vergleichbar mit dem Wildtyp. Dies deutet folglich an, dass kein verstärkter CQ-Influx durch einen einzelnen Aminosäureaustausch vermittelt wurde. Callaghan *et al.* (2016) stellten ebenfalls keine Wachstumsverzögerung im induktiven Hefesystem bei Einführung der K76T-Mutation in den Wildtyp fest. Dass die K76T-Mutation ohne den Hintergrund weiterer Mutationen keinen CQR-Phänotyp vermittelt, wurde konsistent zu dem Ergebnis in dieser Arbeit auch in anderen Untersuchungssystemen berichtet (Sanchez *et al.*, 2007; Summers *et al.*, 2014).

Neben der Bestätigung von CQ als Substrat des in *S. cerevisiae* exprimierten Wildtyps wurden erste Hinweise für eine Erweiterung des Substratspektrums von PfCRT^{3D7} um VP vorgelegt. Über die Trübungsmessung wurde gezeigt, dass das Wachstum von *S. cerevisiae* in Anwesenheit von VP im Medium ebenfalls beeinträchtigt wird. Ähnlich zu CQ vermittelten millimolare Konzentrationen eine Reduktion des Wachstums. Diese war spezifisch für PfCRT^{3D7} exprimierende *S. cerevisiae*, da die Leerplasmid-Kontrolle nicht beeinträchtigt wurde. Diese Beobachtung steht im Kontrast zu Studien in *X. laevis* Oozyten, wobei in diesen der Wildtyp auch keinen CQ-Transport vermittelte. In diesen wird VP als Substrat der CQR-Isoform PfCRT^{Dd2}, nicht jedoch des Wildtyps beschrieben, wobei insgesamt nur eine geringe Signalthöhe beobachtet wurde (Bellanca *et al.*, 2014). Die Schlussfolgerung wurde auch indirekt aus fluorimetrischen Messungen der Alkalisierungsrates der Verdauungsvakuole von kultivierten Plasmodien gezogen, welche einen gemeinschaftlichen Transport mit Protonen anzeigte (Lehane & Kirk, 2010).

5.2.2 Der *rescue*-Assay detektierte keinen PfCRT-Inhibitor in der Malaria Box

Der zuvor beschriebene Phänotyp von PfCRT^{3D7} exprimierenden *S. cerevisiae* wurde für die Testung von 390 Substanzen aus der Malaria-Box nach ihrem PfCRT-Inhibitions Potenzial genutzt. Dabei wurde kein *hit* identifiziert. Der Assay basierte auf einem *rescue*-Prinzip des Hefewachstums. Bei Inhibition des PfCRT^{3D7} sollte eine Regeneration des Hefewachstums in Anwesenheit von CQ im Medium detektiert werden. Dieser Ansatz sollte zudem falsch-positive

Treffer durch zytotoxische Substanzen minimieren, welche in einem Assay, der auf eine Inhibition eines Zellwachstums testet, initial als *hit* gewertet werden würden. Tatsächlich führten etwa zwei Drittel der Substanzen zu einer stärkeren Wachstumsbeeinträchtigung, als bereits durch 10 mM CQ im Medium hervorgerufen wurde, und zeigten damit ein hefetoxisches Potenzial. Die Konzentration von 10 mM CQ wurde auf Basis der zuvor beschriebenen Charakterisierung des Hefewachstums in Anwesenheit von CQ ausgewählt. In dieser Konzentration wurde das Wachstum der PfCRT^{3D7} exprimierenden Hefen um durchschnittlich 85 % reduziert, während das Wachstum der Leerplasmid-Kontrolle in diesem Konzentrationsbereich nicht beeinträchtigt wurde. Diese CQ-Konzentration erfüllte die Voraussetzungen an den *rescue*-Assay, dass (I.) ein für PfCRT^{3D7} spezifischer CQ-Influx der Wachstumsbeeinträchtigung zu Grund liegt und (II.) ein unbeeinträchtigtes Wachstum *per se* möglich ist. Der Einsatz der Substanzen in einer Konzentration von 10 μ M entspricht dem bei Screenings zur *hit*-Identifizierung üblich eingesetzten Konzentrationsbereich (1-10 μ M, Hughes *et al.*, 2011). Die Anforderungen an einen PfCRT-Inhibitor sind in diesem Assay hoch. Bei einer Konzentration von 10 μ M muss der Influx von 10 mM CQ über PfCRT^{3D7} über die Assaydauer von bis zu 3 Tagen inhibiert werden. Dies erfordert eine hohe Affinität zur Zielstruktur und eine Stabilität bei 29 °C im sauren Medium über die Assaydauer. Es ist folglich möglich, dass Substanzen in der Malaria-Box den PfCRT^{3D7} als Zielstruktur adressieren, der Assay dies unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht detektierte. Da die antiplasmodiale Aktivität der Malaria-Box-Substanzen nach 72 h bei 37 °C ermittelt wurde (Duffy & Avery, 2012), kann eine Stabilität über den Assayzeitraum vermutet, aufgrund des sauren pH-Werts jedoch nicht garantiert werden. Das Wachstum der unbeeinträchtigten Hefen war Schwankungen unterworfen. Durch Definition des 100%igen Wachstums auf jeder Testplatte konnten absolute Werte vernachlässigt werden. Die relative Werte der 5-mM- und einer 10-mM-CQ-Kontrolle führten im Durchschnitt zu einem konsistent gehemmten Wachstum, streute jedoch stark um den prozentualen Wachstumswert (Standardabweichung: 10-15 % Wachstum).

Zur Erfassung der Qualität eines Hochdurchsatz-Assays wird zum Beispiel der Z'-Faktor (Zhang *et al.*, 1999) überwacht (Macarron *et al.*, 2011). Dieser erfordert eine Positivkontrolle mit einer Substanz, die zu dem Signal führt, das auch von einer aktiven Probensubstanz erwartet wird. Diese stand für diesen Assay nicht zur Verfügung. Vor dem Hintergrund, dass die Substanzen der Malaria-Box *in vitro* eine antiplasmodiale Aktivität gegen 3D7-Plasmodien (CQS) aufweisen (www.mmv.org, o. D.), wurde die PfCRT^{3D7}-Isoform als mögliche Zielstruktur dieser untersucht. Wäre ein Treffer identifiziert worden, wäre diese Substanz auch als *resistance reverser* einer CQR-Isoform getestet worden. Untersuchungen zur Inhibition des CQ-Transports über PfCRT wurden in *X. laevis* Oozyten durchgeführt und somit an PfCRT^{Dd2} und nicht PfCRT^{3D7}. Synthetisch dargestellte Chinin-Dimere sind die potentesten bekannten PfCRT^{Dd2}-Inhibitoren, die darüber hinaus nicht auch zugleich ein Substrat darstellen. Der

Transport von [³H]-CQ wurde durch diese mit IC₅₀-Werten zwischen 1 µM und 6 µM inhibiert (Hrycyna *et al.*, 2014). Im Vergleich dazu inhibiert VP diesen mit einem IC₅₀ von 30 µM (Hrycyna *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2009). Chinin-Dimere übten eine antiplasmodiale Aktivität aus. Da diese gegenüber CQR-Plasmodien höher war als an CQS-Plasmodien, wurde dies zumindest teilweise einer Interaktion mit dem CQR-PfCRT zugesprochen (Hrycyna *et al.*, 2014). Auf Basis dieser Daten wurden Chinin-Dimere nicht als Positivkontrolle für die PfCRT^{3D7}-Isoform in Betracht gezogen.

Anderen Forschungsgruppen nutzten ebenfalls schon einen speziellen Phänotyp von *S. cerevisiae* für die systematische Testung der Malaria-Box (van Voorhis *et al.*, 2016). Drei von vier zielten auf eine Eingrenzung des Wirkmechanismus durch die unspezifische Beeinflussung metabolischer Wege durch die Wahl der Kulturbedingungen und des Hefestamms ab. Eine weitere Gruppe testete *target*-spezifisch auf die Inhibition eines überexprimierten plasmodialen MPs, dessen Funktion unter den gewählten Bedingungen notwendig für das Überleben der Hefen war (van Voorhis *et al.*, 2016). Ein *target*-spezifischer Ansatz kann potenziell zu Leitstrukturen mit höherer Potenz und Selektivität führen und erfordert kein Re-Screening von Treffern aus einem rein phänotypischen Screening, um den *mode of action*, also den Wirkmechanismus zu identifizieren (Carolino & Winzeler, 2020). Ein *target*-basierter Ansatz bestimmt auch zunehmend die Entwicklung neuer Arzneistoffe (siehe Abschnitt 1.3).

Fong *et al.* (2015) identifizierten zehn Substanzen aus der Malaria-Box, die wie CQ *in vitro* die Formation von β-Hämatin, eines synthetischen Hämozoin (Malariapigment) inhibierten. Da die CQ-Resistenz nicht mit einer veränderten Zielstruktur von CQ einhergeht, lässt diese Identifikation keine Rückschlüsse darauf zu, ob diese Substanzen mit PfCRT interagieren. Angesichts zunehmender Resistenzen besteht nicht nur ein Entwicklungsbedarf von Arzneistoffen einer zweiten Generation, die validierte Zielstrukturen adressieren, sondern auch von solchen, die neue Zielstrukturen und neue Wirkmechanismen aufweisen (malERA Consultative Group on Drugs, 2011). Der Phänotyp von PfCRT exprimierenden *S. cerevisiae* bekräftigt die Annahme, dass dieses plasmodiale MP der determinierende Mechanismus für eine CQ-Resistenz ist, und als Grundlage für die systematische *target*-basierte Testung einer Substanzbibliotheken dienen kann.

Die Malaria-Box bietet den Vorteil, hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität aus vorselektierten Substanzen zu bestehen. Es wurden bereits plasmodiale Zielstrukturen für einige dieser Substanzen identifiziert, wie zum Beispiel die im Abschnitt 5.1 genannten plasmodialen MPs PfFNT (Golldack *et al.*, 2017; Hapuarachchi *et al.*, 2017) und PfHT (Ortiz *et al.*, 2015). Zugleich ist der Umfang begrenzt. Eine erweiterte Anzahl an Substanzen bietet zum Beispiel die TCAMS-Bibliothek (*Tres Cantos Antimalarial Compound Set*) aus > 13.000 Substanzen, welche in einer Konzentration von 2 µM eine inhibitorische Aktivität von ≥ 80 %

gegen *P. falciparum* (3D7) aufweisen (Gamo *et al.*, 2010). Etwa 60 % der Substanzen inhibieren in dieser Konzentration auch zu ≥ 50 % das Wachstum von *P. falciparum* (Dd2) (Gamo *et al.*, 2010). Eine Erhöhung der Anzahl der getesteten Substanzen könnte die Chance auf einen *hit* erhöhen.

5.3 Pentamidin: Substrat oder Inhibitor von TbAQP2?

5.3.1 Risiken und Nebenwirkungen von Ionophoren

Die Auswirkung von drei Ionophoren auf die Funktion der *T. brucei* Aquaglyceroporin-Isoformen 2 und 3 wurde untersucht. Als rekombinante Proteine in osmotisch sensiblen *S. cerevisiae* Protoplasten wurde ihre Funktion über ihre Permeabilität für das neutrale Substrat Glycerol in einem neutralen Assaypuffer erfasst. Die Glycerolaufnahme in *S. cerevisiae* wird durch zwei Komponenten getrieben. Durch einfache Diffusion sowie über eine erleichterte Diffusion über den endogenen Glycerolkanal Fps1 (Luyten *et al.*, 1995). Die Glycerolpermeabilität wird durch Deletion des *fps1*-Gens minimiert (Luyten *et al.*, 1995), wie auch die Kontrollen in dieser Arbeit gezeigt haben. Vor diesem Hintergrund erlaubte der gewählte Hefestamm BY4742 Δ *fps1* die Bestimmung der AQP-spezifischen Glycerolpermeabilität in *S. cerevisiae* und die Betrachtung des Einflusses von Ionophoren auf diese.

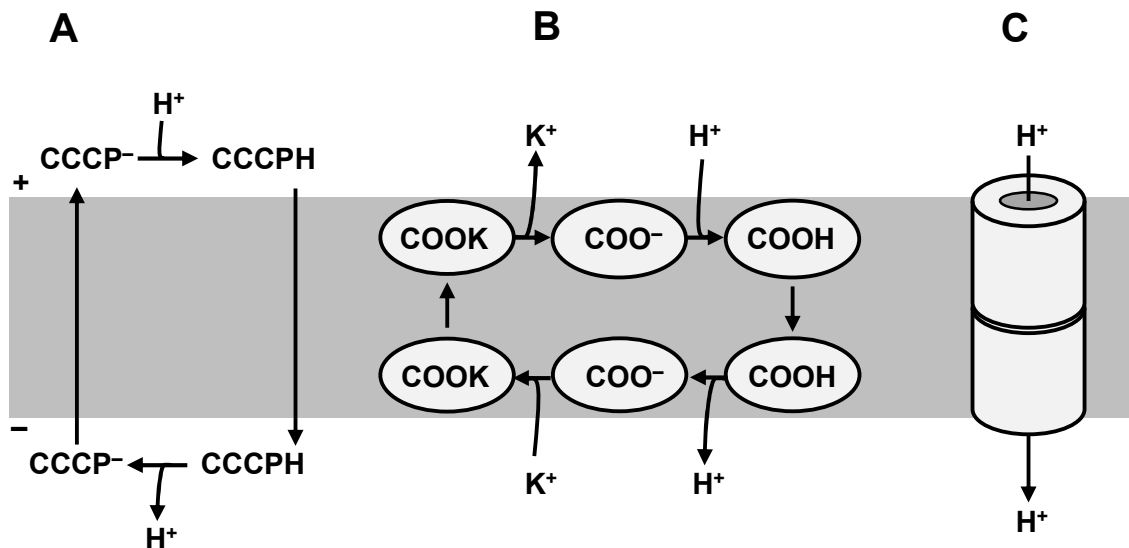


Abb. 5.4 Ionentransportmechanismus der in dieser Arbeit untersuchten Ionophore, in Anlehnung an Nicholls und Ferguson (2013). (A) CCCP zyklisiert durch die Membran und wird dabei durch das Membranpotenzial und einen Protonengradienten angetrieben. (B) Nigericin diffundiert als Carbonsäure oder als Kaliumsalz durch die Membran. (C) Gramicidin bildet eine die Membran durchspannende Pore, die für eine Reihe monovalenter Kationen und Protonen durchlässig ist.

Ionophore sind ein wichtiges Hilfsmittel in der Untersuchung biologischer Prozesse in Zellen. Sie werden in mobile Carrier und Porenbildner eingeteilt, wobei mobile Carrier eine Membranpassage durch die kovalente Bindung von Protonen oder die Bildung eines nicht kovalenten Ionen-Komplexes ermöglichen (Woolley *et al.*, 1995).

Die Glycerolpermeabilität von TbAQP2 wurde durch das Protonophor CCCP inhibiert. CCCP gehört zu den mobilen Carriern und ist eine schwache Säure mit einem ausgedehnten π -Orbitalsystem. Sowohl die anionische als auch die protonierte, neutrale Form können durch die Lipidmembran diffundieren, wobei die Diffusion durch Unterschiede im Membranpotenzial beziehungsweise durch das Vorhandensein eines Protonengradienten getrieben wird (Abb. 5.4, A). Durch den zyklischen Austausch durch die Membran werden die Gradienten aufgehoben, bis die Verhältniss zu beiden Seiten der Membran angeglichen werden (Kasianowicz *et al.*, 1984).

Etwa 2 μ M CCCP führten zu einer 50%igen Reduktion der Glycerolpermeabilität von TbAQP2. Diese Konzentration liegt in dem ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich von bis zu 50 μ M, in dem CCCP zur Aufhebung eines Protonenmembrangradienten eingesetzt wird (Herrington *et al.*, 1996; Quillet-Mary *et al.*, 1997; Vijayvergiya *et al.*, 2004). Der IC_{50} war sogar um eine Größenordnung kleiner als der von Alghamdi *et al.* (2020) berichtete. Die TbAQP3-Funktion wurde in dem Maße erst durch 1 mM CCCP beeinträchtigt. Der zweite untersuchte mobile Carrier Nigericin übte keinen Einfluss auf die Glycerolpermeabilität von TbAQP2 und TbAQP3 aus. Auch der inhibitorische Effekt von Pentamidin auf TbAQP2 wurde nicht beeinflusst. Nigericin ist ebenfalls eine schwache Säure, welcher im Gegensatz zu CCCP ohne Änderung der Nettoladung die Transmembranpassage von Protonen vermittelt. Es tauscht Protonen gegen K^+ aus, wobei eine Bindung dieser über die Carboxylfunktion von Nigericin erfolgt (Pressman *et al.*, 1967) (Abb. 5.4, B). Der Porenbildner Gramicidin beeinträchtigte gleichermaßen die Glycerolpermeabilität beider AQP-Isoformen. Durch die Assoziation von zwei Gramicidin-Molekülen wird eine hydrophile, die Membran durchspannende Pore geschaffen, welche auch für Protonen durchlässig ist (Hladky & Haydon, 1970, 1972) (Abb. 5.4, C). Die beobachteten Effekte der Ionophore lassen auf eine unterschiedliche Interaktion mit den TbAQPs schließen. Angesichts der unterschiedlichen Selektivitätsfilterlayouts ist eine direkte Inhibition durch das kleine Molekül CCCP wahrscheinlich. Da ein Knockout von TbAQP2 keinen Wachstumsdefekt in Trypanosomen verursacht (Baker *et al.*, 2012), ist von einer TbAQP2-Inhibition durch CCCP keine potenzielle antitrypanosomale Wirkung zu erwarten. Das größere Nigericin schien keinen direkten und auch keinen indirekten Effekt in Kombination mit Pentamidin auf die Funktion von TbAQP2 auszuüben. Die Assaybedingungen mit einem neutralen Puffer ohne K^+ -Zusatz haben dies auch nicht forciert. Für Gramicidin kann als integraler Porenbildner ein unspezifischer Einfluss auf die Funktion angenommen werden. Für die Lipidumgebung wird ein modifizierender Einfluss auf die Funktionalität integraler MPs

beschrieben (Lee, 2004). Eine scheinbar unspezifische Inhibition durch eine Störung der Membranintegrität durch die Insertion von Gramicidin in hohen Konzentrationen ist daher vorstellbar. Es gibt Berichte über unspezifische Effekte in hohen Konzentrationen (Takemura *et al.*, 1992) und ungewöhnliche Potenzunterschiede in Abhängigkeit vom Lösungsmittel der Stammlösung (Grosman & Nielsen, 1990). Auch vor einem detergensartigen Effekt in hohen Konzentrationen wird gewarnt, der die Permeabilität der Membranen beeinflusst (Reed, 1979). Ein solcher Effekt wurde an der Leerplasmid-Kontrolle beobachtet, welche durch einen steilen Abfall der Lichtstreuungsintensität anzeigte, dass die Integrität der Membran nicht mehr gegeben war. Nur Ionophorkonzentrationen, die die Permeabilität der Kontrolle nicht beeinflussten, wurden auf einen Effekt auf die TbAQPs untersucht. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Verwendung von Ionophoren Kontrollen für direkte und unspezifische Effekte bei der experimentellen Durchführung eingebaut werden sollten. Ein experimenteller Einsatz sollte berücksichtigen, dass diese chemisch heterogene Substanzklasse mit unterschiedlichen Mechanismen und mit unterschiedlicher Selektivität den Transport von Protonen und Ionen vermittelt. Auch sollte berücksichtigt werden, dass es Unterschiede bezüglich der Elektroneutralität und der Richtung ihres Transports gibt und dass dieser Effekt nicht membran-spezifisch ist (Nicholls & Ferguson, 2013).

5.3.2 Die Kontroverse um den Pentamidin-Aufnahmemechanismus

Ein asymmetrisches Pentamidin-Derivat, Pentamidin-Biotin **9**, zeigte im Lichtstreuungsassay in Gegenwart von ≥ 300 mM Glycerol eine ähnlich hohe Affinität zu TbAQP2 wie Pentamidin und inhibierte die Glycerolpermeabilität ebenfalls im nanomolaren Bereich. Bereits zuvor wurde von Song *et al.* (2016) durch Testung verschiedener asymmetrischer Pentamidin-Derivate gezeigt, dass für eine Inhibition von TbAQP2 eine positiv geladene Amidin-Gruppe ausreicht. Ein kritisches Strukturelement scheint außerdem die Moleküllänge und/oder das Vorhandensein eines zweiten Benzol-Rings zu sein. Die von Song *et al.* (2016) gemessene Inhibition durch verkürzte Pentamidin-Derivate, die nur einen Benzol-Ring aufwiesen, war um einen Faktor > 600 schwächer als für Pentamidin. Pentamidin-Biotin **9** erfüllt demnach die strukturellen Voraussetzungen für eine TbAQP2-Inhibition. Im Gegensatz dazu schlussfolgerten Alghamdi *et al.* (2020) aus ihren Studien zur Struktur-Wirkungsbeziehung, dass für eine hochaffine Bindung an TbAQP2 zwei Amidin-Gruppen benötigt werden. Diese Diskrepanz könnte in der Verwendung unterschiedlicher Substrate begründet sein. Anstelle von Glycerol verwendeten Alghamdi *et al.* (2020) [^3H]-Pentamidin zur Erfassung der TbAQP2-Funktion.

Pentamidin-Biotin **9** beeinträchtigte selbst im mikromolaren Bereich nicht die Viabilität von Trypanosomen. Da die Pentamidin-Kontrolle im Viabilitätsassay zu mit der Literatur vergleichbaren Ergebnisse führte, ist davon auszugehen, dass eine Toxizität von Pentamidin-Biotin **9** in demselben Assay nicht unentdeckt blieb. Die fehlende Toxizität von Pentamidin-

Biotin **9** bedeutet nicht zwingend, dass das Molekül nicht von den Trypanosomen aufgenommen wurde oder nicht seine Zielstruktur erreichen konnte. Da bereits für Pentamidin eine Passage durch die Kanalpore von TbAQP2 angezweifelt wird (Song *et al.*, 2016), wäre eine solche für das noch größere Pentamidin-Biotin-Molekül noch unwahrscheinlicher. Die Vortestung in *S. cerevisiae* Protoplasten legt nahe, dass die Bindung an die Zielstruktur möglich ist, da hier eine ebenso potente Inhibition der TbAQP2 vermittelten Glycerolpermeabilität festgestellt wurde wie für die Originalsubstanz Pentamidin. Da Pentamidin sowie weitere Arzneistoffe aus der Diamidin-Klasse zwei Amidin-Gruppen tragen (De Koning, 2020), ist im Sinne einer Struktur-Funktionsbeziehung vorstellbar, dass zwei Amidin-Gruppen im Molekül für eine trypanozoidale Wirkung nötig sind. Als nicht toxische Substanz, die ein ebenso potenter Inhibitor von TbAQP2 *in vitro* wie die Originalsubstanz darstellt, weist Pentamidin-Biotin **9** die notwendigen Merkmale auf, um den Aufnahmemechanismus von Pentamidin in Trypanosomen zu untersuchen. Es kann in höheren Konzentrationen und für längere Zeitintervalle als Pentamidin eingesetzt werden, ohne zu einer Beeinträchtigung der Zellviabilität zu führen. Über die Biotin-Gruppe wurde die Substanz sowohl von einem Alexa-Fluor®-488-Streptavidin-Konjugat als auch von einem Anti-Biotin-Antikörper selektiv zur DMSO-Kontrolle markiert. Eine Untersuchung der Endozytose-Theorie wurde jedoch durch eine unspezifische Bindung an die Trypanosomenoberfläche beeinträchtigt. Die in Abschnitt 4.3.3 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Bilder sollten daher als Ausgangslage für eine Verfeinerung der experimentellen Methode genutzt werden. Um das Molekül nicht erst intrazellulär zu detektieren, sollte dieses außerdem bereits vor Zugabe zu den Zellen fluoreszenzmarkiert werden. Dafür sollte sowohl ein Alexa-Fluor®-488-Streptavidin-Konjugat als auch ein Anti-Biotin-Antikörper geeignet sein. Die Aufnahme eines entsprechend großen Komplex wäre so nur über Endozytose wahrscheinlich.

Die gegensätzlichen Theorien zum Pentamidin-Aufnahmemechanismus stimmen in ihren Kernaussagen überein. In dem biophysikalischen Lichtstreuungsassay in *S. cerevisiae* wird die Glycerolpermeabilität von TbAQP2, nicht jedoch die von TbAQP3 durch Pentamidin beeinträchtigt (Song *et al.*, 2016). Konsistent hierzu wurde in Trypanosomen durch Knockouts gezeigt, dass TbAQP2 und nicht TbAQP3 für die Pentamidin-Aufnahme verantwortlich ist (Baker *et al.*, 2012). Alghamdi *et al.* (2020) zeigten, dass die Glycerolpermeabilität von TbAQP2 von Pentamidin in nanomolaren Konzentrationen inhibiert wird. Dies steht ebenfalls im Konsens mit dem Ergebnis von Song *et al.* (2016). Ein negatives Membranpotenzial, wie von Alghamdi *et al.* (2020) vorgeschlagen, sollte in beiden Aufnahmetheorien die Attraktion des dikationischen Pentamidins begünstigen.

Im Rahmen der postulierten direkten Passage von Pentamidin durch das Kanalprotein TbAQP2 wird von einem Transportprozess gesprochen (Alghamdi *et al.*, 2020; Baker *et al.*, 2012; Munday *et al.*, 2014). Die Frage, wie TbAQP2 als Kanal Eigenschaften eines

Transporters annehmen soll, wird dabei nicht erörtert. Kanäle und Transporter vermitteln nach unterschiedlichen Mechanismen einen transmembranären Stoffaustausch. Kanäle bilden eine starre Pore, deren Aminosäurekomposition die passive Passage spezifischer Substrate entlang ihres Konzentrationsgradienten erlaubt (Watson, 2015). Nach dem *alternating-access*-Modell unterlaufen Transporter beim Transportprozess eine Konformationsänderung, um das Substrat auf einer Membranseite zu binden und auf der gegenüberliegenden wieder zu entlassen (Jardetzky, 1966). Die maximale Rate der [³H]-Pentamidin-Aufnahme in Trypanosomen wird von Alghamdi *et al.* (2020) auf Basis der Studie von De Koning (2001) wie folgt angegeben: $9,5 \times 10^5$ Moleküle Zelle⁻¹ h⁻¹ für Blutformen sowie $8,5 \times 10^6$ Moleküle Zelle⁻¹ h⁻¹ für prozyklische Trypanosomen. Dies entspricht einer Passage von 0,3-2,4 Pentamidin-Molekülen pro AQP und Sekunde, wenn eine Zahl von nur 1000 TbAQP2-Kopien pro Zelle angenommen wird. Damit wird die Zahl der tatsächlich vorhandenen Kopien vermutlich unterschätzt, da zum Beispiel in humanen Erythrozyten mehrere Zehntausend Kopien von dem humanen AQP1 angenommen werden (58.000 Kopien, Bryk & Wiśniewski, 2017; < 160.000 Kopien, Denker *et al.*, 1988). Die Passage eines Pentamidin-Moleküls würde unter dieser Annahme etwa 1 Sekunde (0,4-3,8 s) benötigen.

Quintana *et al.* (2020) untersuchten die *turnover*-Rate von TbAQP2 und deuten an, dass dieses ubiquitinyliert und in das Lysosom zur Degradierung transportiert wird. Sie geben an, dass etwa 50 % in < 1 h degradiert werden. Die andere Hälfte wurde stabil in Western Blots eines Cycloheximid-Assays detektiert ($t_{1/2} \approx 6$ h). Sie schlagen vor, dass letztere eine Recycling-Fraktion darstellen könnte (Quintana *et al.*, 2020). Bei einer erneuten Annahme von 1000 Kopien, von denen die Hälfte innerhalb einer Stunde internalisiert werden, lässt sich dies bei Annahme der Endozytose-Theorie in eine Passagezeit von etwa 7 Sekunden pro Pentamidin-Molekül übersetzen (1:1 Stöchiometrie).

In jedem Fall sind die berechneten Annahmen deutlich niedriger als die Dauer, die für die Membranpassage eines AQP-Substrats angenommen wird. Diese liegt für Wasser und Glycerol im Nano- bis Mikrosekundenbereich (de Groot & Grubmüller, 2001; Lu *et al.*, 2003). Es ist vorstellbar, dass in den [³H]-Pentamidin-Aufnahmestudien in Trypanosomen nur die Bindung an TbAQP2 gemessen wurde. Die Sättigbarkeit der Pentamidin-Aufnahme wurde als charakterische Carrier-Eigenschaft gedeutet (De Koning, 2001). Angesichts der Hinweise auf eine äußerst langsame Membranpassage könnte eine Sättigung unabhängig vom Mechanismus aufgrund einer limitierten Anzahl an TbAQP2-Kopien verursacht werden. Der Funktionsassay, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist für die Beobachtung schnell ablaufender Prozesse ausgelegt. Es ist ebenso vorstellbar, dass eine Bindung von Pentamidin an TbAQP2 im Rahmen einer langsamen Kanalpassage als Inhibition der Glycerol-permeabilität im Lichtstreuungsassay beobachtet würde. Dass nach unmittelbarer Zugabe von Pentamidin dasselbe Ausmaß der TbAQP2-Inhibition gemessen wurde wie nach

zehnminütiger Vorinkubation, spricht für eine hohe *on*-Rate. Für eine höher aufgelöste Kinetik könnte die Auswirkung von Pentamidin auf die Transmembranpassage von [³H]-Glycerol gemessen werden.

Die Frage nach dem Aufnahmemechanismus kann noch nicht abschließend beantwortet werden. Die spezifische Lokalisation von TbAQP2 in der Flagellartasche in Blutform-Trypanosomen (Baker *et al.*, 2012) und die Ubiquitinilierung von TbAQP2 (Quintana *et al.*, 2020), welches ein Signal für die Translokation in endozytotische Vesikel ist (Hicke & Dunn, 2003), zeigen dass eine Aufnahme im Sinne einer rezeptorvermittelten Endozytose *per se* plausibel ist. Eine Ko-Kristallstruktur einer VSG-Variante mit Suramin gibt neue Einblicke in die Resistenz gegen diesen antitrypanosomalen Arzneistoff (Zeelen *et al.*, 2021), für den ebenfalls eine rezeptorvermittelte Endozytose als Aufnahmemechanismus angenommen wird (Fairlamb & Bowman, 1980; Wiedemar *et al.*, 2019). Im Fall von TbAQP2 und Pentamidin könnten Strukturinformationen eröffnen, ob der Kanal bei Bindung von Pentamidin wie ein Transporter eine Konformationsänderung unternimmt oder ob der Bindemodus dem von Song *et al.* (2016) vorgeschlagenen entspricht, bei welchem Pentamidin an Asp265 bindet.

5.4 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit standen zwei integrale MPs aus protozoischen Erregern im Fokus, die bei Übertragung durch ihre Vektoren auf den Menschen potenziell letale Infektionskrankheiten verursachen. Dabei wurden auch grundlegende Fragen zum Transport von Arzneistoffen durch diese MPs untersucht. Auch wenn die klinische Anwendung von Chloroquin und Pentamidin teils durch Resistenzen, teils durch neu entwickelte Arzneistoffe mit besseren pharmakodynamischen und -kinetischen Eigenschaften reduziert wird, bleibt die Erforschung von Arzneistoffen mit langjähriger klinischer Erfahrung zukunftsweisend. Diese Arbeit hat ein CF-System zum Erhalt von rekombinanten PfCRT vorgestellt, welches zukünftig für weitere strukturelle und funktionelle Studien genutzt werden kann, um die Transporteigenschaften näher zu untersuchen. Außerdem wurde ein Assay zum Screening von potenziellen PfCRT-Inhibitoren vorgestellt. Das am Wildtyp gezeigte Assayprinzip ist dabei auch übertragbar auf andere PfCRT-Isoformen, sodass die Suche nach Inhibitoren ausgeweitet werden könnte. Wenn auch der Aufnahmemechanismus von Pentamidin über TbAQP2 nicht visualisiert werden konnte, wurde doch die Eignung eines Pentamidin-Derivats dafür evaluiert. Und die Studien an Ionophoren haben die Relevanz von Kontrollen im experimentellen Design verdeutlicht.

6 References

- Abdel-Muhsin A.-M.A., Mackinnon M.J., Ali E., Nassir E.-K.A., Suleiman S., Ahmed S., et al. (2004) Evolution of drug-resistance genes in *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission in Eastern Sudan. *J Infect Dis*, **189**, 1239–1244.
- Aikawa M. (1972) High-resolution autoradiography of malarial parasites treated with 3 H-chloroquine. *Am J Pathol*, **67**, 277–284.
- Alghamdi A.H., Munday J.C., Campagnaro G.D., Gurvic D., Svensson F., Okpara C.E., et al. (2020) Positively selected modifications in the pore of TbAQP2 allow pentamidine to enter *Trypanosoma brucei*. *Elife*, **9**, e56416.
- Allen J.P., Feher G., Yeates T.O., Komiya H., Rees D.C. (1987) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6162–6166.
- Allen R.J.W., Kirk K. (2004) Cell volume control in the *Plasmodium*-infected erythrocyte. *Trends Parasitol*, **20**, 7–10.
- Alsford S., Eckert S., Baker N., Glover L., Sanchez-Flores A., Leung K.F., et al. (2012) High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature*, **482**, 232–236.
- Alsford S., Horn D. (2008) Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **161**, 76–79.
- Andréll J., Tate C.G. (2013) Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Mol Membr Biol*, **30**, 52–63.
- Ariey F., Fandeur T., Durand R., Randrianarivelosoa M., Jambou R., Legrand E., et al. (2006) Invasion of Africa by a single *pfprt* allele of South East Asian type. *Malar J*, **5**, 1–5.
- Arnemann J. (2019) DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 3rd edn. Springer Reference Medizin, pp. 719. Eds A. M. Gressner and T. Arndt. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Arnold P., Himmels P., Weiß S., Decker T.-M., Markl J., Gatterdam V., et al. (2014) Antigenic and 3D structural characterization of soluble X4 and hybrid X4-R5 HIV-1 Env trimers. *Retrovirology*, **11**, 42.
- Avrahami-Moyal L., Engelberg D., Wenger J.W., Sherlock G., Braun S. (2012) Turbidostat culture of *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A under selective pressure elicited by ethanol selects for mutations in SSD1 and UTH1. *FEMS Yeast Res*, **12**, 521–533.
- Bacchi C.J., Nathan H.C., Hutner S.H., McCann P.P., Sjoerdsma A. (1980) Polyamine metabolism: A potential therapeutic target in trypanosomes. *Science*, **210**, 332–334.
- Baker M.R., Fan G., Serysheva I.I. (2015) Single-Particle Cryo-EM of the Ryanodine Receptor Channel in an Aqueous Environment. *Eur J Transl Myol*, **25**, 4803.

- Baker N., Alsford S., Horn D. (2011) Genome-wide RNAi screens in African trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. *Mol Biochem Parasitol*, **176**, 55–57.
- Baker N., Glover L., Munday J.C., Aguinaga Andrés D., Barrett M.P., de Koning H.P., et al. (2012) Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 10996–11001.
- Bakouh N., Bellanca S., Nyboer B., Moliner Cubel S., Karim Z., Sanchez C.P., et al. (2017) Iron is a substrate of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter PfCRT in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*, **292**, 16109–16121.
- Baranwal S., Azad G.K., Singh V., Tomar R.S. (2014) Signaling of chloroquine-induced stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae requires the Hog1 and Slf2 mitogen-activated protein kinase pathways. *Antimicrob Agents Chemother*, **58**, 5552–5566.
- Baro N.K., Callaghan P.S., Roepe P.D. (2013) Function of resistance conferring Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter isoforms. *Biochemistry*, **52**, 4242–4249.
- Baro N.K., Pooput C., Roepe P.D. (2011) Analysis of chloroquine resistance transporter (CRT) isoforms and orthologues in S. cerevisiae yeast. *Biochemistry*, **50**, 6701–6710.
- Bartossek T., Jones N.G., Schäfer C., Cvitković M., Glogger M., Mott H.R., et al. (2017) Structural basis for the shielding function of the dynamic trypanosome variant surface glycoprotein coat. *Nat Microbiol*, **2**, 1523–1532.
- Bayburt T.H., Grinkova Y.V., Sligar S.G. (2002) Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Lett.*, **2**, 853–856.
- Beitz E., Wu B., Holm L.M., Schultz J.E., Zeuthen T. (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 269–274.
- Bellanca S., Summers R.L., Meyrath M., Dave A., Nash M.N., Dittmer M., et al. (2014) Multiple drugs compete for transport via the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter at distinct but interdependent sites. *J Biol Chem*, **289**, 36336–36351.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., et al. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **28**, 235–242.
- Bernaudeau F., Frelet-Barrand A., Pochon N., Dementin S., Hivin P., Boutigny S., et al. (2011) Heterologous expression of membrane proteins: Choosing the appropriate host. *PLoS One*, **6**, e29191.
- Bernhard F., Tozawa Y. (2013) Cell-free expression - making a mark. *Curr Opin Struct Biol*, **23**, 374–380.

- Bill R.M., Henderson P.J.F., Iwata S., Kunji E.R.S., Michel H., Neutze R., et al. (2011) Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nat Biotechnol*, **29**, 335–340.
- Bitonti A.J., Sjoerdsma A., McCann P.P., Kyle D.E., Oduola A.M., Rossan R.N., et al. (1988) Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science*, **242**, 1301–1303.
- Bland J.M., Altman D.G. (2000) Statistics notes. The odds ratio. *BMJ*, **320**, 1468.
- Bloland P.B. (2001) *Drug resistance in malaria: A background document for the WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4*. Geneva, Switzerland. 27 pp.
- Bloland P.B., Lackritz E.M., Kazembe P.N., Were J.B., Steketee R., Campbell C.C. (1993) Beyond chloroquine: Implications of drug resistance for evaluating malaria therapy efficacy and treatment policy in Africa. *J Infect Dis*, **167**, 932–937.
- Blundell T.L., Sibanda B.L., Montalvão R.W., Brewerton S., Chelliah V., Worth C.L., et al. (2006) Structural biology and bioinformatics in drug design: Opportunities and challenges for target identification and lead discovery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **361**, 413–423.
- Bock S. (2014) *Zellfreie Synthese von schwer herstellbaren Proteinen*. Dissertation. Kiel.
- Boddey J.A., Cowman A.F. (2013) *Plasmodium* nesting: Remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu Rev Microbiol*, **67**, 243–269.
- Bornhorst J.A., Falke J.J. (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol*, **326**, 245–254.
- Borst P. (2002) Antigenic variation and allelic exclusion. *Cell*, **109**, 5–8.
- Bourzac K. (2014) Infectious disease: Beating the big three. *Nature*, **507**, 4–7.
- Bowie J. (2001) Stabilizing membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 397–402.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254.
- Bray P.G., Howells R.E., Ritchie G.Y., Ward S.A. (1992) Rapid chloroquine efflux phenotype in both chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol*, **44**, 1317–1324.
- Bray P.G., Mungthin M., Hastings I.M., Biagini G.A., Saidu D.K., Lakshmanan V., et al. (2006) PfCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: Regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX. *Mol Microbiol*, **62**, 238–251.
- Bremer H., Dennis P.P. (2008) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell at different exponential growth rates. *EcoSal Plus*, **3**.

- Breyton C., Javed W., Vermot A., Arnaud C.-A., Hajjar C., Dupuy J., et al. (2019) Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1861**, 939–957.
- Bryk A.H., Wiśniewski J.R. (2017) Quantitative analysis of human red blood cell proteome. *J Proteome Res*, **16**, 2752–2761.
- Büscher P., Cecchi G., Jamonneau V., Priotto G. (2017) Human African trypanosomiasis. *Lancet*, **390**, 2397–2409.
- Bushell E., Gomes A.R., Sanderson T., Anar B., Girling G., Herd C., et al. (2017) Functional profiling of a Plasmodium genome reveals an abundance of essential genes. *Cell*, **170**, 260-272.e8.
- Callaghan P.S., Siriwardana A., Hassett M.R., Roepe P.D. (2016) Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (PfCRT) isoforms PH1 and PH2 perturb vacuolar physiology. *Malar J*, **15**, 186.
- Callaway E. (2020) Revolutionary cryo-EM is taking over structural biology. *Nature*, **578**, 201.
- Capela R., Moreira R., Lopes F. (2019) An overview of drug resistance in protozoal diseases. *Int J Mol Sci*, **20**, 5748.
- Carolino K., Winzeler E.A. (2020) The antimalarial resistome - finding new drug targets and their modes of action. *Curr Opin Microbiol*, **57**, 49–55.
- Casal M., Queirós O., Talaia G., Ribas D., Paiva S. (2016) Carboxylic acids plasma membrane transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Yeast Membrane Transport*, 1st edn. Advances in Experimental Medicine and Biology 892, pp. 229–251. Eds J. Ramos, H. Sychrová, and M. Kschischo. Cham, Switzerland: Springer.
- Chae P.S., Rasmussen S.G.F., Rana R.R., Gotfryd K., Chandra R., Goren M.A., et al. (2010) Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods*, **7**, 1003–1008.
- Chaijaroenkul W., Ward S.A., Mungthin M., Johnson D., Owen A., Bray P.G., et al. (2011) Sequence and gene expression of chloroquine resistance transporter (pfcr1) in the association of in vitro drugs resistance of Plasmodium falciparum. *Malar J*, **10**, 42.
- Chamberlin M., Ring J. (1973) Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. 1. General properties of the enzymatic reaction and the template specificity of the enzyme. *J Biol Chem*, **248**, 2235–2244.
- Chappuis F., Lima M.A., Flevaud L., Ritmeijer K. (2010) Human African trypanosomiasis in areas without surveillance. *Emerg Infect Dis*, **16**, 354–356.
- Chaptal V., Delolme F., Kilburg A., Magnard S., Montigny C., Picard M., et al. (2017) Quantification of detergents complexed with membrane proteins. *Sci Rep*, **7**, 41751.

- Chen N., Kyle D.E., Pasay C., Fowler E.V., Baker J., Peters J.M., et al. (2003) pfcrt Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 3500–3505.
- Cheng Y. (2015) Single-particle cryo-EM at crystallographic resolution. *Cell*, **161**, 450–457.
- Cheng Y., Grigorieff N., Penczek P.A., Walz T. (2015) A primer to single-particle cryo-electron microscopy. *Cell*, **161**, 438–449.
- Chipot C., Dehez F., Schnell J.R., Zitzmann N., Pebay-Peyroula E., Catoire L.J., et al. (2018) Perturbations of native membrane protein structure in alkyl phosphocholine detergents: A critical assessment of NMR and biophysical studies. *Chem Rev*, **118**, 3559–3607.
- Christis C., Lubsen N.H., Braakman I. (2008) Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J*, **275**, 4700–4727.
- Cody C.W., Prasher D.C., Westler W.M., Prendergast F.G., Ward W.W. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*, **32**, 1212–1218.
- Cohen F.L., Tartasky D. (1997) Microbial resistance to drug therapy: A review. *Am J Infect Control*, **25**, 51–64.
- Cohen N.R., Lobritz M.A., Collins J.J. (2013) Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe*, **13**, 632–642.
- Cooper R.A., Ferdig M.T., Su X.-z., Ursos L.M.B., Mu J., Nomura T., et al. (2002) Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol*, **61**, 35–42.
- Coppens I., Opperdoes F.R., Courtoy P.J., Baudhuin P. (1987) Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool*, **34**, 465–473.
- Coulter C.B., Stone F.M., Kabat E.A. (1936) The Structure of the ultraviolet absorption spectra of certain proteins and amino acids. *J Gen Physiol*, **19**, 739–752.
- Cowman A.F., Healer J., Marapana D., Marsh K. (2016) Malaria: Biology and disease. *Cell*, **167**, 610–624.
- Cowman A.F., Karcz S., Galatis D., Culvenor J.G. (1991) A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J Cell Biol*, **113**, 1033–1042.
- Crisp G.T., Jiang Y.-L. (2001) Intramolecular hydrogen bonding of (+)-biotin and biotin derivatives in organic solvents. *ARKIVOC*, **7**, 77–87.
- Croston G.E. (2017) The utility of target-based discovery. *Expert Opin Drug Discovery*, **12**, 427–429.
- Dagnogo O., Ako A.B., Ouattara L., Dago N.D., Coulibaly D.N.'g., Touré A.O., et al. (2018) Towards a re-emergence of chloroquine sensitivity in Côte d'Ivoire? *Malar J*, **17**, 413.

- D'Avanzo N., McCusker E.C., Powl A.M., Miles A.J., Nichols C.G., Wallace B.A. (2013) Differential lipid dependence of the function of bacterial sodium channels. *PLoS One*, **8**, e61216.
- David H.A., Hartley H.O., Pearson E.S. (1954) The distribution of the ratio, in a single normal sample, of range to standard deviation. *Biometrika*, **41**, 482–493.
- de Groot B.L., Grubmüller H. (2001) Water permeation across biological membranes: Mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **294**, 2353–2357.
- De Koning H.P. (2001) Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: Implications for cross-resistance with arsenicals. *Mol Pharmacol*, **59**, 586–592.
- De Koning H.P. (2020) The drugs of sleeping sickness: Their mechanisms of action and resistance, and a brief history. *Trop Med Infect Dis*, **5**, 14.
- de Winter J.C.F. (2013) Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. *Pract Assess Res Evaluation*, **18**, 12.
- Deeks E.D. (2019) Fexinidazole: First global approval. *Drugs*, **79**, 215–220.
- Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, **318**, 618–624.
- Deng X., Gujjar R., El Mazouni F., Kaminsky W., Malmquist N.A., Goldsmith E.J., et al. (2009) Structural plasticity of malaria dihydroorotate dehydrogenase allows selective binding of diverse chemical scaffolds. *J Biol Chem*, **284**, 26999–27009.
- Denisov I.G., Grinkova Y.V., Lazarides A.A., Sligar S.G. (2004) Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J Am Chem Soc*, **126**, 3477–3487.
- Denker B.M., Smith B.L., Kuhajda F.P., Agre P. (1988) Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem*, **263**, 15634–15642.
- Djimé A., Doumbo O.K., Cortese J.F., Kayentao K., Doumbo S., Diourté Y., et al. (2001) A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med*, **344**, 257–263.
- Djimé A.A., Dolo A., Ouattara A., Diakité S., Plowe C.V., Doumbo O.K. (2004) Molecular diagnosis of resistance to antimalarial drugs during epidemics and in war zones. *J Infect Dis*, **190**, 853–855.
- Djimé A.A., Doumbo O.K., Traore O., Guindo A.B., Kayentao K., Diourte Y., et al. (2003) Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, **69**, 558–563.
- Dobson C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature*, **426**, 884–890.

- Dondapati S.K., Stech M., Zemella A., Kubick S. (2020) Cell-free protein synthesis: A promising option for future drug development. *BioDrugs*, **34**, 327–348.
- Dondorp A.M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyo A.P., Tarning J., et al. (2009) Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*, **361**, 455–467.
- Drew D., Lerch M., Kunji E., Slotboom D.-J., Gier J.-W. de (2006) Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat Methods*, **3**, 303–313.
- Duffy S., Avery V.M. (2012) Development and optimization of a novel 384-well anti-malarial imaging assay validated for high-throughput screening. *Am J Trop Med Hyg*, **86**, 84–92.
- Dukkipati A., Park H.H., Waghray D., Fischer S., Garcia K.C. (2008) BacMam system for high-level expression of recombinant soluble and membrane glycoproteins for structural studies. *Protein Expr Purif*, **62**, 160–170.
- Eder J., Sedrani R., Wiesmann C. (2014) The discovery of first-in-class drugs: Origins and evolution. *Nat Rev Drug Discov*, **13**, 577–587.
- Edlind T.D., Katiyar S.K. (2010) Mutational analysis of flucytosine resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 4733–4738.
- Engstler M., Pfohl T., Herminghaus S., Boshart M., Wiegertjes G., Heddergott N., et al. (2007) Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell*, **131**, 505–515.
- Engstler M., Thilo L., Weise F., Grünfelder C.G., Schwarz H., Boshart M., et al. (2004) Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, **117**, 1105–1115.
- Fairlamb A.H., Bowman I.B.R. (1980) Uptake of the trypanocidal drug suramin by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and its effect on respiration and growth rate in vivo. *Mol Biochem Parasitol*, **1**, 315–333.
- Fairlamb A.H., Gow N.A.R., Matthews K.R., Waters A.P. (2016) Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Nat Microbiol*, **1**, 16092.
- Fan X., Wang J., Zhang X., Yang Z., Zhang J.-C., Zhao L., et al. (2019) Single particle cryo-EM reconstruction of 52 kDa streptavidin at 3.2 Angstrom resolution. *Nat Commun*, **10**, 2386.
- Fenn K., Matthews K.R. (2007) The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Curr Opin Microbiol*, **10**, 539–546.
- Fernandez-Leiro R., Scheres S.H.W. (2016) Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature*, **537**, 339–346.
- Fèvre E.M., Coleman P.G., Odiit M., Magona J.W., Welburn S.C., Woolhouse M.E.J. (2001) The origins of a new *Trypanosoma brucei* rhodesiense sleeping sickness outbreak in eastern Uganda. *Lancet*, **358**, 625–628.

- Fidock D.A., Nomura T., Talley A.K., Cooper R.A., Dzekunov S.M., Ferdig M.T., et al. (2000) Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, **6**, 861–871.
- Fitch C.D. (1969) Chloroquine resistance in malaria: A deficiency of chloroquine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **64**, 1181–1187.
- Fitch C.D. (1970) *Plasmodium falciparum* in owl monkeys: Drug resistance and chloroquine binding capacity. *Science*, **169**, 289–290.
- Fong K.Y., Sandlin R.D., Wright D.W. (2015) Identification of β -hematin inhibitors in the MMV Malaria Box. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **5**, 84–91.
- Footo S.J., Kyle D.E., Martin R.K., Oduola A.M., Forsyth K., Kemp D.J., et al. (1990) Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **345**, 255–258.
- Footo S.J., Thompson J.K., Cowman A.F., Kemp D.J. (1989) Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell*, **57**, 921–930.
- Franco J.R., Cecchi G., Priotto G., Paone M., Diarra A., Grout L., et al. (2020) Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis at continental and country level: Update to 2018. *PLoS Negl Trop Dis*, **14**, e0008261.
- Frommel T.O., Balber A.E. (1987) Flow cytofluorimetric analysis of drug accumulation by multidrug-resistant *Trypanosoma brucei brucei* and *T. b. rhodesiense*. *Mol Biochem Parasitol*, **26**, 183–191.
- Fu D., Libson A., Miercke L.J., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J., et al. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, **290**, 481–486.
- Gamo F.-J., Sanz L.M., Vidal J., Cozar C. de, Alvarez E., Lavandera J.-L., et al. (2010) Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*, **465**, 305–310.
- Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., et al. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419**, 498–511.
- Geary T.G., Jensen J.B., Ginsburg H. (1986) Uptake of [3 H]chloroquine by drug-sensitive and -resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol*, **35**, 3805–3812.
- Geertsma E.R., Groeneveld M., Slotboom D.-J., Poolman B. (2008) Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5722–5727.
- Gell D.A., Grant R.P., Mackay J.P. (2012) The detection and quantitation of protein oligomerization. In *Protein dimerization and oligomerization in biology*. Advances in Experimental Medicine and Biology 747, pp. 19–41. Ed J. M. Matthews. New York, NY, US: Springer.

- Gewering T., Janulienė D., Ries A.B., Moeller A. (2018) Know your detergents: A case study on detergent background in negative stain electron microscopy. *J Struct Biol*, **203**, 242–246.
- Gietz D.R., Woods R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, **350**, 87–96.
- Glorigijevic B., Bennett T., McAllister R., Urbach J.S., Roepe P.D. (2006) Spinning disk confocal microscopy of live, intraerythrocytic malarial parasites. 2. Altered vacuolar volume regulation in drug resistant malaria. *Biochemistry*, **45**, 12411–12423.
- Glorigijevic B., Purdy K., Elliott D.A., Cooper R.A., Roepe P.D. (2008) Stage independent chloroquine resistance and chloroquine toxicity revealed via spinning disk confocal microscopy. *Mol Biochem Parasitol*, **159**, 7–23.
- Goldberg D.E., Slater A.F., Cerami A., Henderson G.B. (1990) Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: An ordered process in a unique organelle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 2931–2935.
- Golding N., Wilson A.L., Moyes C.L., Cano J., Pigott D.M., Velayudhan R., et al. (2015) Integrating vector control across diseases. *BMC Med*, **13**, 249.
- Golldack A., Henke B., Bergmann B., Wiechert M., Erler H., Blancke Soares A., et al. (2017) Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the *Plasmodium* lactate transporter PfFNT at nanomolar scale. *PLoS Pathog*, **13**, e1006172.
- Gourbal B., Sonuc N., Bhattacharjee H., Legare D., Sundar S., Ouellette M., et al. (2004) Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem*, **279**, 31010–31017.
- Graf F.E., Ludin P., Wenzler T., Kaiser M., Brun R., Pyana P.P., et al. (2013) Aquaporin 2 mutations in *Trypanosoma brucei* gambiense field isolates correlate with decreased susceptibility to pentamidine and melarsoprol. *PLoS Negl Trop Dis*, **7**, e2475.
- Graf F.E., Mäser P. (2017) Drug Resistance in *Trypanosoma brucei*. In *Antimicrobial drug resistance: Mechanisms of drug resistance*, Vol. 1, 2nd edn., pp. 667–676. Eds D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, and D. Marchaim. Cham, Switzerland: Springer.
- Gräslund S., Nordlund P., Weigelt J., Hallberg B.M., Bray J., Gileadi O., et al. (2008) Protein production and purification. *Nat Methods*, **5**, 135–146.
- Grosman N., Nielsen J.K. (1990) Unusual effects of the ionophore A23187 at suboptimal concentrations in mast cell histamine release. *Agents Actions*, **30**, 131–133.
- Hajek P., Bader A., Helmstetter F., Henke B., Arnold P., Beitz E. (2019) Cell-free and yeast-based production of the malarial lactate transporter, PfFNT, delivers comparable yield and protein quality. *Front Pharmacol*, **10**, 375.

- Haldar K., Bhattacharjee S., Safeukui I. (2018) Drug resistance in Plasmodium. *Nat Rev Microbiol*, **16**, 156–170.
- Hansen C. (2019) *Zellfreie Transportproteinsynthese mit Nanodisc-Technologie für Strukturuntersuchungen und phänotypisches Wirkstoffscreening in der Hefe*. Unveröffentlichte Masterarbeit. Kiel.
- Hapuarachchi S.V., Cobbold S.A., Shafik S.H., Dennis A.S.M., McConville M.J., Martin R.E., et al. (2017) The malaria parasite's lactate transporter PfFNT is the target of antiplasmodial compounds in whole cell phenotypic screens. *PLoS Pathog*, **13**, e1006180.
- Hauer F., Gerle C., Fischer N., Oshima A., Shinzawa-Itoh K., Shimada S., et al. (2015) GraDeR: Membrane protein complex preparation for single-particle cryo-EM. *Structure*, **23**, 1769–1775.
- Hayward R., Saliba K.J., Kirk K. (2006) The pH of the digestive vacuole of Plasmodium falciparum is not associated with chloroquine resistance. *J Cell Sci*, **119**, 1016–1025.
- He Y., Wang K., Yan N. (2014) The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein Cell*, **5**, 658–672.
- Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*, **373**, 663–664.
- Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12501–12504.
- Helmstetter F., Arnold P., Höger B., Petersen L.M., Beitz E. (2019) Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. *J Biol Chem*, **294**, 623–631.
- Hemingway J., Ranson H., Magill A., Kolaczinski J., Fornadel C., Gimnig J., et al. (2016) Averting a malaria disaster: Will insecticide resistance derail malaria control? *Lancet*, **387**, 1785–1788.
- Heptinstall J., Rapley R. (2000) Spectrophotometric Analysis of Nucleic Acids. In *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Springer protocols handbooks, pp. 57–60. Ed R. Rapley. Totowa, NJ, US: Humana Press.
- Herrington J., Park Y.B., Babcock D.F., Hille B. (1996) Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca²⁺ loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron*, **16**, 219–228.
- Herzik M.A., Wu M., Lander G.C. (2019) High-resolution structure determination of sub-100 kDa complexes using conventional cryo-EM. *Nat Commun*, **10**, 1032.
- Hicke L., Dunn R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 141–172.
- Hirumi H., Hirumi K. (1989) Continuous cultivation of Trypanosoma brucei blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J Parasitol*, **75**, 985.

- Hladky S.B., Haydon D.A. (1970) Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics. *Nature*, **225**, 451–453.
- Hladky S.B., Haydon D.A. (1972) Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **274**, 294–312.
- Ho C.-M., Beck J.R., Lai M., Cui Y., Goldberg D.E., Egea P.F., et al. (2018) Malaria parasite translocon structure and mechanism of effector export. *Nature*, **561**, 70–75.
- Hol W., Verlinde C. (2001) Macromolecular crystallography and medicine. In *Crystallography of biological macromolecules*, 1st edn. International tables for crystallography Volume F, pp. 10–25. Eds M. G. Rossmann and E. Arnold. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Holm-Bertelsen J. (2016) *Expressionssysteme zur Gewinnung von rekombinantem PfFNT zur Reinigung, Funktionsuntersuchung & Kristallisation*. Dissertation. Kiel.
- Holm-Bertelsen J., Bock S., Helmstetter F., Beitz E. (2016) High-level cell-free production of the malarial lactate transporter PfFNT as a basis for crystallization trials and directional transport studies. *Protein Expr Purif*, **126**, 109–114.
- Hotez P.J., Aksoy S., Brindley P.J., Kamhawi S. (2020) What constitutes a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis*, **14**, e0008001.
- Hrycyna C.A., Summers R.L., Lehane A.M., Pires M.M., Namanja H., Bohn K., et al. (2014) Quinine dimers are potent inhibitors of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and are active against quinoline-resistant P. falciparum. *ACS Chem Biol*, **9**, 722–730.
- Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B., Philpott K.L. (2011) Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol*, **162**, 1239–1249.
- Ihori Y., Shinoki Y., Inoue S., Nishimura S., Makita S., Tanaka T., Shibayama K., Kang C.-K. (2015) *Aryl amidine compound and bactericidal agent* (WO/2015/087857).
- Institute of Medicine of the National Academies (2004) *Saving lives, buying time: Economics of malaria drugs in an age of resistance*. Washington, DC, US. 384 pp.
- Irvin J.L., Irvin E.M. (1947) Spectrophotometric and potentiometric evaluation of apparent acid dissociation exponents of various 4-aminoquinoline lines. *J Am Chem Soc*, **69**, 1091–1099.
- Iwata S., Byrne B. (2003) How to use this book. In *Methods and results in crystallization of membrane proteins*. IUL biotechnology series 4, pp. 3–10. Ed S. Iwata. La Jolla, CA, US: International University Line.
- Jack D.L., Yang N.M., Saier M.H. (2001) The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem*, **268**, 3620–3639.

- Jaehme M., Michel H. (2013) Evaluation of cell-free protein synthesis for the crystallization of membrane proteins--a case study on a member of the glutamate transporter family from *Staphylothermus marinus*. *FEBS J*, **280**, 1112–1125.
- Jardetzky O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature*, **211**, 969–970.
- Johnson D.J., Fidock D.A., Mungthin M., Lakshmanan V., Sidhu A.B.S., Bray P.G., et al. (2004) Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Molecular Cell*, **15**, 867–877.
- Juge N., Moriyama S., Miyaji T., Kawakami M., Iwai H., Fukui T., et al. (2015) *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter is a H⁺-coupled polyspecific nutrient and drug exporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 3356–3361.
- Kamya M.R., Bakyaite N.N., Talisuna A.O., Were W.M., Staedke S.G. (2002) Increasing antimalarial drug resistance in Uganda and revision of the national drug policy. *Trop Med Int Health*, **7**, 1031–1041.
- Kapishnikov S., Grolimund D., Schneider G., Pereiro E., McNally J.G., Als-Nielsen J., et al. (2017) Unraveling heme detoxification in the malaria parasite by in situ correlative X-ray fluorescence microscopy and soft X-ray tomography. *Sci Rep*, **7**, 7610.
- Kasianowicz J., Benz R., McLaughlin S. (1984) The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *J Membr Biol*, **82**, 179–190.
- Katzen F., Chang G., Kudlicki W. (2005) The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol*, **23**, 150–156.
- Khoshouei M., Radjainia M., Baumeister W., Danev R. (2017) Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate. *Nat Commun*, **8**, 16099.
- Kim J., Tan Y.Z., Wicht K.J., Erramilli S.K., Dhingra S.K., Okombo J., et al. (2019) Structure and drug resistance of the *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT. *Nature*, **576**, 315–320.
- Kiselev N.A., Sherman M.B., Tsuprun V.L. (1990) Negative staining of proteins. *Electron Microsc Rev*, **3**, 43–72.
- Klammt C., Schwarz D., Fendler K., Haase W., Dötsch V., Bernhard F. (2005) Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J*, **272**, 6024–6038.
- Klebe G. (2009) *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 637 pp.
- Klein D.J., Moore P.B., Steitz T.A. (2004) The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit. *RNA*, **10**, 1366–1379.

- Klonis N., Tan O., Jackson K., Goldberg D., Klemba M., Tilley L. (2007) Evaluation of pH during cytosomal endocytosis and vacuolar catabolism of haemoglobin in *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*, **407**, 343–354.
- Kotov V., Bartels K., Veith K., Josts I., Subhramanyam U.K.T., Günther C., et al. (2019) High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins. *Sci Rep*, **9**, 10379.
- Kouyaté B., Sie A., Yé M., Allegri M. de, Müller O. (2007) The great failure of malaria control in Africa: A district perspective from Burkina Faso. *PLoS Med*, **4**, e127.
- Krogstad D.J., Gluzman I.Y., Kyle D.E., Oduola A.M., Martin S.K., Milhous W.K., et al. (1987) Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: Mechanism of chloroquine resistance. *Science*, **238**, 1283–1285.
- Krugliak M., Zhang J., Ginsburg H. (2002) Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol Biochem Parasitol*, **119**, 249–256.
- Kublin J.G., Cortese J.F., Njunju E.M., Mukadam R.A.G., Wirima J.J., Kazembe P.N., et al. (2003) Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis*, **187**, 1870–1875.
- Kühlbrandt W. (2014a) Biochemistry. The resolution revolution. *Science*, **343**, 1443–1444.
- Kühlbrandt W. (2014b) Cryo-EM enters a new era. *Elife*, **3**, e03678.
- Kunji E.R.S., Harding M., Butler P.J.G., Akamine P. (2008) Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography. *Methods*, **46**, 62–72.
- Lakshmanan V., Bray P.G., Verdier-Pinard D., Johnson D.J., Horrocks P., Muhle R.A., et al. (2005) A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance. *EMBO J*, **24**, 2294–2305.
- Le Maire M., Champeil P., Møller J.V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1508**, 86–111.
- Lee A.G. (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1666**, 62–87.
- Légaré D., Richard D., Mukhopadhyay R., Stierhof Y.D., Rosen B.P., Haimeur A., et al. (2001) The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem*, **276**, 26301–26307.
- Lehane A.M., Hayward R., Saliba K.J., Kirk K. (2008) A verapamil-sensitive chloroquine-associated H⁺ leak from the digestive vacuole in chloroquine-resistant malaria parasites. *J Cell Sci*, **121**, 1624–1632.

- Lehane A.M., Kirk K. (2008) Chloroquine resistance-conferring mutations in pfcr1 give rise to a chloroquine-associated H⁺ leak from the malaria parasite's digestive vacuole. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 4374–4380.
- Lehane A.M., Kirk K. (2010) Efflux of a range of antimalarial drugs and 'chloroquine resistance reversers' from the digestive vacuole in malaria parasites with mutant PfCRT. *Mol Microbiol*, **77**, 1039–1051.
- Lekostaj J.K., Natarajan J.K., Paguio M.F., Wolf C., Roepe P.D. (2008) Photoaffinity labeling of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter with a novel perfluorophenylazido chloroquine. *Biochemistry*, **47**, 10394–10406.
- Leviatan S., Sawada K., Moriyama Y., Nelson N. (2010) Combinatorial method for overexpression of membrane proteins in Escherichia coli. *J Biol Chem*, **285**, 23548–23556.
- Lew V.L., Tiffert T., Ginsburg H. (2003) Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Blood*, **101**, 4189–4194.
- Lewis I.A., Wacker M., Olszewski K.L., Cobbold S.A., Baska K.S., Tan A., et al. (2014) Metabolic QTL analysis links chloroquine resistance in Plasmodium falciparum to impaired hemoglobin catabolism. *PLoS Genet*, **10**, e1004085.
- Li H., Chen H., Steinbronn C., Wu B., Beitz E., Zeuthen T., et al. (2011) Enhancement of proton conductance by mutations of the selectivity filter of aquaporin-1. *J Mol Biol*, **407**, 607–620.
- Liu D.Q., Liu R.J., Ren D.X., Gao D.Q., Zhang C.Y., Qui C.P., et al. (1995) Changes in the resistance of Plasmodium falciparum to chloroquine in Hainan, China. *Bull World Health Organ*, **73**, 483–486.
- Liu J., Istvan E.S., Gluzman I.Y., Gross J., Goldberg D.E. (2006) Plasmodium falciparum ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8840–8845.
- Liu Y., Engelman D.M., Gerstein M. (2002) Genomic analysis of membrane protein families: Abundance and conserved motifs. *Genome Biol*, **3**, research0054.
- Lorber B., Bishop J.B., DeLucas L.J. (1990) Purification of octyl β-d-glucopyranoside and re-estimation of its micellar size. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1023**, 254–265.
- Lu D., Grayson P., Schulten K. (2003) Glycerol conductance and physical asymmetry of the Escherichia coli glycerol facilitator GlpF. *Biophys J*, **85**, 2977–2987.
- Lundstrom K. (2006) Structural genomics for membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2597–2607.
- Luyten K., Albertyn J., Skibbe W.F., Prior B.A., Ramos J., Thevelein J.M., et al. (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J*, **14**, 1360–1371.

- Lyu M., Su C.-C., Kazura J.W., Yu E.W. (2021) Structural basis of transport and inhibition of the Plasmodium falciparum transporter PfFNT. *EMBO Rep*, **22**, e51628.
- Macarron R., Banks M.N., Bojanic D., Burns D.J., Cirovic D.A., Garyantes T., et al. (2011) Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov*, **10**, 188–195.
- Macomber P.B., O'Brien R.L., Hahn F.E. (1966) Chloroquine: Physiological basis of drug resistance in Plasmodium berghei. *Science*, **152**, 1374–1375.
- Maguire M.E., Cowan J.A. (2002) Magnesium chemistry and biochemistry. *Biometals*, **15**, 203–210.
- malERA Consultative Group on Drugs (2011) A research agenda for malaria eradication: Drugs. *PLoS Med*, **8**, e1000402.
- Malik E.M., Mohamed T.A., Elmardi K.A., Mowien R.M., Elhassan A.H., Elamin S.B., et al. (2006) From chloroquine to artemisinin-based combination therapy: The Sudanese experience. *Malar J*, **5**, 65.
- Mang'era C.M., Mbai F.N., Omedo I.A., Mireji P.O., Omar S.A. (2012) Changes in genotypes of Plasmodium falciparum human malaria parasite following withdrawal of chloroquine in Tiwi, Kenya. *Acta Trop*, **123**, 202–207.
- Marquis N., Gourbal B., Rosen B.P., Mukhopadhyay R., Ouellette M. (2005) Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant Leishmania. *Mol Microbiol*, **57**, 1690–1699.
- Marsiccobetre S., Rodríguez-Acosta A., Lang F., Figarella K., Uzcátegui N.L. (2017) Aquaglyceroporins are the entry pathway of boric acid in Trypanosoma brucei. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1859**, 679–685.
- Martin R.E., Kirk K. (2004) The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Mol Biol Evol*, **21**, 1938–1949.
- Martin R.E., Marchetti R.V., Cowan A.I., Howitt S.M., Bröer S., Kirk K. (2009) Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science*, **325**, 1680–1682.
- Martin S.K., Oduola A.M., Milhous W.K. (1987) Reversal of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum by verapamil. *Science*, **235**, 899–901.
- Matthews K.R. (2005) The developmental cell biology of Trypanosoma brucei. *J Cell Sci*, **118**, 283–290.
- Mauritz J.M.A., Esposito A., Ginsburg H., Kaminski C.F., Tiffert T., Lew V.L. (2009) The homeostasis of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *PLoS Comput Biol*, **5**, e1000339.
- McPherson A., Gavira J.A. (2014) Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F*, **70**, 2–20.

- Meier A., Erler H., Beitz E. (2018) Targeting channels and transporters in protozoan parasite infections. *Front Chem*, **6**, 88.
- Mejía-Barajas J.A., Montoya-Pérez R., Salgado-Garciglia R., Aguilera-Aguirre L., Cortés-Rojo C., Mejía-Zepeda R., et al. (2017) Oxidative stress and antioxidant response in a thermotolerant yeast. *Braz J Microbiol*, **48**, 326–332.
- Merk A., Bartesaghi A., Banerjee S., Falconieri V., Rao P., Davis M.I., et al. (2016) Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery. *Cell*, **165**, 1698–1707.
- Metcalf B.W., Bey P., Danzin C., Jung M.J., Casara P., Vever J.P. (1978) Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.17) by substrate and product analogs. *J Am Chem Soc*, **100**, 2551–2553.
- Michel H. (2001) Crystallization of membrane proteins. In *Crystallography of biological macromolecules*, 1st edn. International tables for crystallography Volume F, pp. 94–99. Eds M. G. Rossmann and E. Arnold. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Moore S.A., Harris A.A., Palepu R.M. (2007) Spectroscopic investigations on the binding of ammonium salt of 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid with non-ionic surfactant micelles in aqueous media. *Fluid Phase Equilibria*, **251**, 110–113.
- Moulder J.W., Evans E.A. (1946) The biochemistry of the malaria parasite. *J Biol Chem*, **164**, 145–157.
- Mugnier M.R., Stebbins C.E., Papavasiliou F.N. (2016) Masters of disguise: Antigenic variation and the VSG coat in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog*, **12**, e1005784.
- Müller-Lucks A., Bock S., Wu B., Beitz E. (2012) Fluorescent in situ folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLoS One*, **7**, e42186.
- Müller-Lucks A., Gena P., Frascaria D., Altamura N., Svelto M., Beitz E., et al. (2013) Preparative scale production and functional reconstitution of a human aquaglyceroporin (AQP3) using a cell free expression system. *N Biotechnol*, **30**, 545–551.
- Munday J.C., Eze A.A., Baker N., Glover L., Clucas C., Aguinaga Andrés D., et al. (2014) *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs. *J Antimicrob Chemother*, **69**, 651–663.
- Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., et al. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, **407**, 599–605.
- Mus-Veteau I. (2010) Heterologous Expression of Membrane Proteins for Structural Analysis. In *Heterologous expression of membrane proteins: Methods and protocols*. Methods in Molecular Biology 601, pp. 1–16. Ed I. Mus-Veteau. New York, NY, USA: Humana Press.

- Mutabingwa T.K. (2005) Artemisinin-based combination therapies (ACTs): Best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! *Acta Trop*, **95**, 305–315.
- Naudé B., Brzostowski J.A., Kimmel A.R., Wellems T.E. (2005) Dictyostelium discoideum expresses a malaria chloroquine resistance mechanism upon transfection with mutant, but not wild-type, Plasmodium falciparum transporter PfCRT. *J Biol Chem*, **280**, 25596–25603.
- Nessler S., Friedrich O., Bakouh N., Fink R.H.A., Sanchez C.P., Planelles G., et al. (2004) Evidence for activation of endogenous transporters in Xenopus laevis oocytes expressing the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter, PfCRT. *J Biol Chem*, **279**, 39438–39446.
- Newby Z.E.R., O'Connell J., Robles-Colmenares Y., Khademi S., Miercke L.J., Stroud R.M. (2008) Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite Plasmodium falciparum. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 619–625.
- Newby Z.E.R., O'Connell J.D., Gruswitz F., Hays F.A., Harries W.E.C., Harwood I.M., et al. (2009) A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation. *Nat Protoc*, **4**, 619–637.
- Newstead S., Ferrandon S., Iwata S. (2008) Rationalizing alpha-helical membrane protein crystallization. *Protein Sci*, **17**, 466–472.
- Nicholls D.G., Ferguson S. (2013) *Bioenergetics*. 4th edn. London, UK: Academic Press. 434 pp.
- Nierhaus K.H. (2014) Mg²⁺, K⁺, and the ribosome. *J Bacteriol*, **196**, 3817–3819.
- Noedl H., Se Y., Schaecher K., Smith B.L., Socheat D., Fukuda M.M. (2008) Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med*, **359**, 2619–2620.
- Novikova I.V., Sharma N., Moser T., Sontag R., Liu Y., Collazo M.J., et al. (2018) Protein structural biology using cell-free platform from wheat germ. *Adv Struct Chem Imaging*, **4**, 13.
- Nygaard R., Kim J., Mancía F. (2020) Cryo-electron microscopy analysis of small membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **64**, 26–33.
- Olafson K.N., Ketchum M.A., Rimer J.D., Vekilov P.G. (2015) Mechanisms of hematin crystallization and inhibition by the antimalarial drug chloroquine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 4946–4951.
- Onyango R.J., van Hoeve K., Raadt P. de (1966) The epidemiology of Trypanosoma rhodesiense sleeping sickness in alego location, Central Nyanza, Kenya I. Evidence that cattle may act as reservoir hosts of trypanosomes infective to man. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **60**, 175–182.

- Ord R., Alexander N., Dunyo S., Hallett R., Jawara M., Targett G., et al. (2007) Seasonal carriage of pfcr1 and pfmdr1 alleles in Gambian Plasmodium falciparum imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *J Infect Dis*, **196**, 1613–1619.
- Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, **273**, 1392–1395.
- Ortiz D., Guiguemde W.A., Johnson A., Elya C., Anderson J., Clark J., et al. (2015) Identification of selective inhibitors of the Plasmodium falciparum hexose transporter PfHT by screening focused libraries of anti-malarial compounds. *PLoS One*, **10**, e0123598.
- Overington J.P., Al-Lazikani B., Hopkins A.L. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 993–996.
- Pagola S., Stephens P.W., Bohle D.S., Kosar A.D., Madsen S.K. (2000) The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*, **404**, 307–310.
- Paguio M.F., Cabrera M., Roepe P.D. (2009) Chloroquine transport in Plasmodium falciparum. 2. Analysis of PfCRT-mediated drug transport using proteoliposomes and a fluorescent chloroquine probe. *Biochemistry*, **48**, 9482–9491.
- Park J.H., Saier M.H. (1996) Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol*, **153**, 171–180.
- Parker J.L., Newstead S. (2016) Membrane protein crystallisation: Current trends and future perspectives. In *The next generation in membrane protein structure determination*. Advances in Experimental Medicine and Biology 922, pp. 61–72. Ed I. Moraes. Cham, Switzerland: Springer.
- Payne D. (1987) Spread of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum. *Parasitology Today*, **3**, 241–246.
- Pearson E.S., Stephens M.A. (1964) The ratio of range to standard deviation in the same normal sample. *Biometrika*, **51**, 484–487.
- Petersen L.M. (2017) *Zellfreie Synthese und Reinigung des Chloroquin-Resistenz-Transporters aus Plasmodium falciparum*. Unveröffentlichte Masterarbeit. Kiel.
- Petersen L.M., Beitz E. (2020) The ionophores CCCP and gramicidin but not nigericin inhibit Trypanosoma brucei aquaglyceroporins at neutral pH. *Cells*, **9**, 2335.
- Picot S., Olliaro P., Monbrison F. de, Bienvenu A.-L., Price R.N., Ringwald P. (2009) A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. *Malar J*, **8**, 89.
- Pingoud A., Jeltsch A. (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3705–3727.

- Plowe C.V., Roper C., Barnwell J.W., Happi C.T., Joshi H.H., Mbacham W., et al. (2007) World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: Molecular markers for drug resistant malaria. *Malar J*, **6**, 121.
- Po H.N., Senozan N.M. (2001) The Henderson-Hasselbalch equation: Its history and limitations. *Journal of Chemical Education*, **78**, 1499.
- Pressman B.C., Harris E.J., Jagger W.S., Johnson J.H. (1967) Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **58**, 1949–1956.
- Price R.N., Uhlemann A.-C., Brockman A., McGready R., Ashley E., Phaipun L., et al. (2004) Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*, **364**, 438–447.
- Privé G.G. (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods*, **41**, 388–397.
- Pulcini S., Staines H.M., Lee A.H., Shafik S.H., Bouyer G., Moore C.M., et al. (2015) Mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, PfCRT, enlarge the parasite's food vacuole and alter drug sensitivities. *Sci Rep*, **5**, 14552.
- Quillet-Mary A., Jaffrézou J.P., Mansat V., Bordier C., Naval J., Laurent G. (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 21388–21395.
- Quintana J.F., Bueren-Calabuig J., Zuccotto F., de Koning H.P., Horn D., Field M.C. (2020) Instability of aquaglyceroporin (AQP) 2 contributes to drug resistance in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis*, **14**, e0008458.
- Qureshi A.A., Suades A., Matsuoka R., Brock J., McComas S.E., Nji E., et al. (2020) The molecular basis for sugar import in malaria parasites. *Nature*, **578**, 321–325.
- Rambow J., Wu B., Rönfeldt D., Beitz E. (2014) Aquaporins with anion/monocarboxylate permeability: Mechanisms, relevance for pathogen-host interactions. *Front Pharmacol*, **5**, 199.
- Rampersad S.N. (2012) Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, **12**, 12347–12360.
- Rask-Andersen M., Almén M.S., Schiöth H.B. (2011) Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, **10**, 579–590.
- Rath A., Deber C.M. (2013) Correction factors for membrane protein molecular weight readouts on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **434**, 67–72.
- Rathod P.K., McErlean T., Lee P.C. (1997) Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9389–9393.

- Räz B., Iten M., Grether-Bühler Y., Kaminsky R., Brun R. (1997) The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (T.b. rhodesiense and T.b. gambiense) in vitro. *Acta Trop*, **68**, 139–147.
- RCSB Protein Data Bank (30.01.21) PDB Statistics: Protein-only structures released per year. URL <https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-protein> [accessed on 03.02.21].
- Reed M.B., Saliba K.J., Caruana S.R., Kirk K., Cowman A.F. (2000) Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **403**, 906–909.
- Reed P.W. (1979) Ionophores. In *Biomembranes Part F: Bioenergetics: Oxidative Phosphorylation*. Methods in Enzymology 55, pp. 435–454. Eds S. Fleischer and L. Packer. New York, NY, US: Academic Press.
- Reeves D.C., Liebelt D.A., Lakshmanan V., Roepe P.D., Fidock D.A., Akabas M.H. (2006) Chloroquine-resistant isoforms of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter acidify lysosomal pH in HEK293 cells more than chloroquine-sensitive isoforms. *Mol Biochem Parasitol*, **150**, 288–299.
- Ren M. (2019) Greater political commitment needed to eliminate malaria. *Infect Dis Poverty*, **8**, 28.
- Ritchie T.K., Grinkova Y.V., Bayburt T.H., Denisov I.G., Zolnerciks J.K., Atkins W.M., et al. (2009) Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol*, **464**, 211–231.
- Roepe P.D. (2011) PfCRT-mediated drug transport in malarial parasites. *Biochemistry*, **50**, 163–171.
- Rollo I.M., Williamson J. (1951) Acquired resistance to 'Melarsen', tryparsamide and amidines in pathogenic trypanosomes after treatment with 'Melarsen' alone. *Nature*, **167**, 147–148.
- Rothnie A.J. (2016) Detergent-free membrane protein purification. In *Heterologous expression of membrane proteins: Methods and protocols*, Second edition. Methods in Molecular Biology 1432. Ed I. Mus-Veteau. New York, NY, USA: Humana Press.
- Rozov A., Khusainov I., El Omari K., Duman R., Mykhaylyk V., Yusupov M., et al. (2019) Importance of potassium ions for ribosome structure and function revealed by long-wavelength X-ray diffraction. *Nat Commun*, **10**, 2519.
- Ryabova L.A., Vinokurov L.M., Shekhovtsova E.A., Alakhov Y.B., Spirin A.S. (1995) Acetyl phosphate as an energy source for bacterial cell-free translation systems. *Anal Biochem*, **226**, 184–186.
- Sachs J., Malaney P. (2002) The economic and social burden of malaria. *Nature*, **415**, 680–685.

- Sagné C., Isambert M.F., Henry J.P., Gasnier B. (1996) SDS-resistant aggregation of membrane proteins: Application to the purification of the vesicular monoamine transporter. *Biochem J*, **316**, 825–831.
- Sanchez C.P., Rohrbach P., McLean J.E., Fidock D.A., Stein W.D., Lanzer M. (2007) Differences in trans-stimulated chloroquine efflux kinetics are linked to PfCRT in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, **64**, 407–420.
- Sanchez C.P., Stein W., Lanzer M. (2003) Trans stimulation provides evidence for a drug efflux carrier as the mechanism of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry*, **42**, 9383–9394.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463–5467.
- Sayers E.W., Cavanaugh M., Clark K., Ostell J., Pruitt K.D., Karsch-Mizrachi I. (2020) GenBank. *Nucleic Acids Res*, **48**, D84–D86.
- Schneider B., Junge F., Shirokov V.A., Durst F., Schwarz D., Dötsch V., et al. (2010) Membrane protein expression in cell-free systems. In *Heterologous expression of membrane proteins: Methods and protocols*. Methods in Molecular Biology 601, pp. 165–186. Ed I. Mus-Veteau. New York, NY, USA: Humana Press.
- Schumann Burkard G., Jutzi P., Roditi I. (2011) Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Mol Biochem Parasitol*, **175**, 91–94.
- Schuwirth B.S., Borovinskaya M.A., Hau C.W., Zhang W., Vila-Sanjurjo A., Holton J.M., et al. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, **310**, 827–834.
- Schwarz D., Junge F., Durst F., Frölich N., Schneider B., Reckel S., et al. (2007) Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc*, **2**, 2945–2957.
- Schwede A., Macleod O.J.S., MacGregor P., Carrington M. (2015) How does the VSG coat of bloodstream form African trypanosomes interact with external proteins? *PLoS Pathog*, **11**, e1005259.
- Shafik S.H., Cobbold S.A., Barkat K., Richards S.N., Lancaster N.S., Llinás M., et al. (2020) The natural function of the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Nat Commun*, **11**, 3922.
- Sidhu A.B.S., Uhlemann A.-C., Valderramos S.G., Valderramos J.-C., Krishna S., Fidock D.A. (2006) Decreasing pfmdr1 copy number in *plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis*, **194**, 528–535.
- Siegel S. (1957) Nonparametric statistics. *Am Stat*, **11**, 13.

- Simarro P.P., Cecchi G., Paone M., Franco J.R., Diarra A., Ruiz J.A., et al. (2010) The atlas of human african trypanosomiasis: A contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int J Health Geogr*, **9**, 57.
- Smith B.J. (1985) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In *Proteins. Methods in Molecular Biology* 1, pp. 41–55. Ed J. M. Walker. Clifton, NJ, US: Humana Press.
- Smith R., Coast J. (2013) The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ*, **346**, f1493.
- Song J., Baker N., Rothert M., Henke B., Jeacock L., Horn D., et al. (2016) Pentamidine is not a permeant but a nanomolar inhibitor of the Trypanosoma brucei aquaglyceroporin-2. *PLoS Pathog*, **12**, e1005436.
- Sonoda Y., Cameron A., Newstead S., Omote H., Moriyama Y., Kasahara M., et al. (2010) Tricks of the trade used to accelerate high-resolution structure determination of membrane proteins. *FEBS Lett*, **584**, 2539–2547.
- Spangenberg T., Burrows J.N., Kowalczyk P., McDonald S., Wells T.N.C., Willis P. (2013) The open access malaria box: A drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS One*, **8**, e62906.
- Stetsenko A., Guskov A. (2017) An overview of the top ten detergents used for membrane protein crystallization. *Crystals*, **7**, 197.
- Stock D., Leslie A.G., Walker J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, **286**, 1700–1705.
- Strop P., Brunger A.T. (2005) Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins. *Protein Sci*, **14**, 2207–2211.
- Su X.-z., Kirkman L.A., Fujioka H., Wellems T.E. (1997) Complex polymorphisms in an ~330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant P. falciparum in Southeast Asia and Africa. *Cell*, **91**, 593–603.
- Sui H., Han B.G., Lee J.K., Walian P., Jap B.K. (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, **414**, 872–878.
- Summers R.L., Dave A., Dolstra T.J., Bellanca S., Marchetti R.V., Nash M.N., et al. (2014) Diverse mutational pathways converge on saturable chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, E1759-67.
- Summers R.L., Martin R.E. (2010) Functional characteristics of the malaria parasite's "chloroquine resistance transporter": Implications for chemotherapy. *Virulence*, **1**, 304–308.
- Swinney D.C. (2013) Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin Pharmacol Ther*, **93**, 299–301.
- Swinney D.C., Anthony J. (2011) How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov*, **10**, 507–519.

- Szumilas M. (2010) Explaining odds ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*, **19**, 227–229.
- Takemura H., Li Z., Ohshika H. (1992) Practical usage concentrations of monensin have non-specific actions other than as a sodium ionophore in rat parotid acinar cells. *Biochem Pharmacol*, **44**, 1395–1400.
- Tan S., Tan H.T., Chung M.C.M. (2008) Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*, **8**, 3924–3932.
- Tan W., Gou D.M., Tai E., Zhao Y.Z., Chow L.M.C. (2006) Functional reconstitution of purified chloroquine resistance membrane transporter expressed in yeast. *Arch Biochem Biophys*, **452**, 119–128.
- Tate C.G. (2001) Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett*, **504**, 94–98.
- Thompson A.A., Liu J.J., Chun E., Wacker D., Wu H., Cherezov V., et al. (2011) GPCR stabilization using the bicelle-like architecture of mixed sterol-detergent micelles. *Methods*, **55**, 310–317.
- Thonghin N., Kargas V., Clews J., Ford R.C. (2018) Cryo-electron microscopy of membrane proteins. *Methods*, **147**, 176–186.
- Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, **405**, 647–655.
- Tran C.V., Saier M.H. (2004) The principal chloroquine resistance protein of *Plasmodium falciparum* is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Microbiology (Reading)*, **150**, 1–3.
- Ursing J., Rombo L., Bergqvist Y., Rodrigues A., Kofoed P.-E. (2016) High-dose chloroquine for treatment of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, **213**, 1315–1321.
- Ursing J., Rombo L., Eksborg S., Larson L., Bruvoll A., Tarning J., et al. (2020) High-dose chloroquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria is well tolerated and causes similar QT interval prolongation as standard-dose chloroquine in children. *Antimicrob Agents Chemother*, **64**.
- Uzcátegui N.L., Szallies A., Pavlovic-Djuranovic S., Palmada M., Figarella K., Boehmer C., et al. (2004) Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, **279**, 42669–42676.
- Uzcátegui N.L., Figarella K., Bassarak B., Meza N.W., Mukhopadhyay R., Ramirez J.L., et al. (2013) *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporins facilitate the uptake of arsenite and antimonite in a pH dependent way. *Cell Physiol Biochem*, **32**, 880–888.
- Uzcátegui N.L., Figarella K., Segnini A., Marsiccobetre S., Lang F., Beitz E., et al. (2018) *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporins mediate the transport of metabolic end-products:

- Methylglyoxal, D-lactate, L-lactate and acetate. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1860**, 2252–2261.
- van Schalkwyk D.A., Egan T.J. (2006) Quinoline-resistance reversing agents for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat*, **9**, 211–226.
- van Schalkwyk D.A., Walden J.C., Smith P.J. (2001) Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* using combinations of chemosensitizers. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 3171–3174.
- van Voorhis W.C., Adams J.H., Adelfio R., Ahyong V., Akabas M.H., Alano P., et al. (2016) Open source drug discovery with the malaria box compound collection for neglected diseases and beyond. *PLoS Pathog*, **12**, e1005763.
- Vandeputte P., Pineau L., Larcher G., Noel T., Brèthes D., Chabasse D., et al. (2011) Molecular mechanisms of resistance to 5-fluorocytosine in laboratory mutants of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, **171**, 11–21.
- Verdier F., Le Bras J., Clavier F., Hatin I., Blayo M.C. (1985) Chloroquine uptake by *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes during in vitro culture and its relationship to chloroquine resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **27**, 561–564.
- Vijayvergiya C., Angelis D. de, Walther M., Kühn H., Duvoisin R.M., Smith D.H., et al. (2004) High-level expression of rabbit 15-lipoxygenase induces collapse of the mitochondrial pH gradient in cell culture. *Biochemistry*, **43**, 15296–15302.
- Vincent I.M., Creek D., Watson D.G., Kamleh M.A., Woods D.J., Wong P.E., et al. (2010) A molecular mechanism for eflornithine resistance in african trypanosomes. *PLoS Pathog*, **6**, e1001204.
- Vos T., Lim S.S., Abbafati C., Abbas K.M., Abbasi M., Abbasifard M., et al. (2020) Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet*, **396**, 1204–1222.
- Wagner S., Bader M.L., Drew D., Gier J.-W. de (2006) Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends Biotechnol*, **24**, 364–371.
- Waldo G.S., Standish B.M., Berendzen J., Terwilliger T.C. (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, **17**, 691–695.
- Waller K.L., Muhle R.A., Ursos L.M., Horrocks P., Verdier-Pinard D., Sidhu A.B.S., et al. (2003) Chloroquine resistance modulated in vitro by expression levels of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. *J Biol Chem*, 33593–33601.
- Walliker D., Quakyi I.A., Wellems T.E., McCutchan T.F., Szarfman A., London W.T., et al. (1987) Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, **236**, 1661–1666.

- Wallin E., Heijne G. von (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, **7**, 1029–1038.
- Wamae K., Okanda D., Ndwiga L., Osoti V., Kimenyi K.M., Abdi A.I., et al. (2019) No evidence of *P. falciparum* K13 artemisinin conferring mutations over a 24-year analysis in Coastal Kenya, but a near complete reversion to chloroquine wild type parasites. *Antimicrob Agents Chemother*, **63**, e01067-19.
- Wan L.S., Poon P.K. (1969) Effect of salts on the surface-interfacial tension and critical micelle concentration of surfactants. *J Pharm Sci*, **58**, 1562–1567.
- Wang P., Read M., Sims P.F., Hyde J.E. (1997) Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol*, **23**, 979–986.
- Wang Y., Geer L.Y., Chappey C., Kans J.A., Bryant S.H. (2000) Cn3D: Sequence and structure views for Entrez. *Trends Biochem Sci*, **25**, 300–302.
- Ward S.A., Bray P.G. (2001) Is reversal of chloroquine resistance ready for the clinic? *Lancet*, **357**, 904.
- Watson H. (2015) Biological membranes. *Essays Biochem*, **59**, 43–69.
- Webster P., Griffiths G. (1994) A novel method for mean cell volume estimation. *J Microsc*, **174**, 85–92.
- Wellems T.E., Panton L.J., Gluzman I.Y., do Rosario V.E., Gwadz R.W., Walker-Jonah A., et al. (1990) Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*, **345**, 253–255.
- Wellems T.E., Walker-Jonah A., Panton L.J. (1991) Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3382–3386.
- White N.J. (2002) The assessment of antimalarial drug efficacy. *Trends Parasitol*, **18**, 458–464.
- White N.J. (2006) Malaria--time to act. *N Engl J Med*, **355**, 1956–1957.
- White N.J., Nosten F., Looareesuwan S., Watkins W.M., Marsh K., Snow R.W., et al. (1999) Averting a malaria disaster. *Lancet*, **353**, 1965–1967.
- White N.J., Pukrittayakamee S., Hien T.T., Faiz M.A., Mokuolu O.A., Dondorp A.M. (2014) Malaria. *Lancet*, **383**, 723–735.
- White S. (30.01.21) Membrane proteins of known 3D structure. URL <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/> [accessed on 03.02.21].
- WHO (1967) *Chemotherapy of Malaria: Report of a WHO scientific group*. World Health Organization technical report series 375. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 92 pp.

- WHO (1998) *Control and surveillance of african trypanosomiasis: Report of a WHO expert committee*. WHO technical report series 881. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 113 pp.
- WHO (2006) Human african trypanosomiasis (sleeping sickness): Epidemiological update. *Wkly Epidemiol Rec*, **81**, 71–80.
- WHO (2009) *The selection and use of essential medicines: Report of the WHO expert committee 2009 (including the 16th WHO model list of essential medicines and the 2nd WHO model list for children)*. WHO technical report series. Geneva: World Health Organization. 259 pp.
- WHO (2010) *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases*. WHO report on neglected tropical diseases 1. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 172 pp.
- WHO (2013) *Control and surveillance of human african trypanosomiasis: Report of a WHO expert committee*. WHO technical report series 984. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 237 pp.
- WHO (2014) *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 232 pp.
- WHO (2015a) *Global technical strategy for malaria, 2016-2030*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 32 pp.
- WHO (2015b) *Guidelines for the treatment of malaria*. 3rd edn. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 316 pp.
- WHO (2019) *WHO interim guidelines for the treatment of gambiense human African trypanosomiasis*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 44 pp.
- WHO (2020a) *Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response: 10 years of surveillance (2010–2019)*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 78 pp.
- WHO (2020b) *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 299 pp.
- Wiedemar N., Zwyer M., Zoltner M., Cal M., Field M.C., Mäser P. (2019) Expression of a specific variant surface glycoprotein has a major impact on suramin sensitivity and endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *FASEB Bioadv*, **1**, 595–608.
- Wiener M.C. (2004) A pedestrian guide to membrane protein crystallization. *Methods*, **34**, 364–372.
- Wiser M.F. (2011) *Protozoa and human disease*. New York, NY, USA: Garland Science. 218 pp.
- Woolley A.G., Pfeiffer D.R., Deber C.M. (1995) Use of ionophores for manipulating intracellular ion concentrations. In *Measurement and manipulation of intracellular ions*.

- Methods in Neurosciences 27, pp. 52–68. Eds J. Kraicer and J. Dixon. San Diego, CA, US: Academic Press.
- Wootton J.C., Feng X., Ferdig M.T., Cooper R.A., Mu J., Baruch D.I., et al. (2002) Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **418**, 320–323.
- Wree D., Wu B., Zeuthen T., Beitz E. (2011) Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion. *FEBS J*, **278**, 740–748.
- Wright D.J., O'Reilly M., Tisi D. (2018) Engineering and purification of a thermostable, high-yield, variant of PfCRT, the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. *Protein Expr Purif*, **141**, 7–18.
- Wu B., Beitz E. (2007) Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 2413–2421.
- Wu B., Rambow J., Bock S., Holm-Bertelsen J., Wiechert M., Soares A.B., et al. (2015) Identity of a *Plasmodium* lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun*, **6**, 6284.
- Wu B., Steinbronn C., Alsterfjord M., Zeuthen T., Beitz E. (2009) Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *EMBO J*, **28**, 2188–2194.
- www.anatrace.com (o. D.) [accessed on 29.03.21].
- www.embryotox.de (o. D.) Arzneimittelsicherheit in Schwangerschaft und Stillzeit: Chloroquin. URL <https://www.embryotox.de/arzneimittel/details/chloroquin/> [accessed on January 21, 2021].
- www.mmv.org (o. D.) Malaria box supporting information | medicines for malaria venture. URL <https://www.mmv.org/mmv-open/malaria-box/malaria-box-supporting-information> [accessed on March 20, 2021].
- Yang F., Moss L.G., Phillips G.N. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, **14**, 1246–1251.
- Yayon A., Cabantchik Z.I., Ginsburg H. (1984) Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J*, **3**, 2695–2700.
- Yayon A., Cabantchik Z.I., Ginsburg H. (1985) Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 2784–2788.
- Yorke W., Hawking F. (1932) Studies in chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*, **26**, 215–237.
- Zardoya R. (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell*, **97**, 397–414.
- Zawada J., Swartz J. (2006) Effects of growth rate on cell extract performance in cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng*, **94**, 618–624.

- Zeelen J., van Straaten M., Verdi J., Hempelmann A., Hashemi H., Perez K., et al. (2021) Structure of trypanosome coat protein VSG_{sur} and function in suramin resistance. *Nat Microbiol*, **6**, 392–400.
- Zeuthen T., Wu B., Pavlovic-Djuranovic S., Holm L.M., Uzcategui N.L., Duszenko M., et al. (2006) Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, **61**, 1598–1608.
- Zhang, Chung, Oldenburg (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, **4**, 67–73.
- Zhang H., Howard E.M., Roepe P.D. (2002) Analysis of the antimalarial drug resistance protein PfCRT expressed in yeast. *J Biol Chem*, **277**, 49767–49775.

7 Anhang

7.1 Open reading frame (ORF) der codonoptimierten *pfcr*-Sequenz

Die für an das *codon usage* von *E. coli* optimierte Sequenz von PfCRT^{3D7} ist in Abb. 7.1 angegeben. Abb. 7.2 gibt die Sequenz der PfCRT^{Dd2}-Variante an, die durch ortsspezifische Mutagenese erhalten wurde.

```

ATGACTAGT

ATGAAATTCGCGAGCAAGAAGAATAATCAGAAGAACAGCAGCAAGAACGATGAAC
GCTACCGTGAACCTGGATAACCTGGTGCAAGAAGGCAACGGTTCTAGACTGGGTGG
CGGTAGCTGCCTGGGCAAGTGCGCGCACGTGTTCAAACCTGATCTTCAAGGAGATC
AAGGACAACATCTTCATCTACATCCTGAGCATCATCTACCTGAGCGTGTGCGTTA
TGAACAAGATTTTCGCGAAACGTACCCTGAACAAGATCGGTAACCTACAGCTTTGT
GACCAGCGAAACCCACAACCTTCATTTGCATGATCATGTTCTTTATCGTTTACAGC
CTGTTTCGGCAACAAGAAAGGTAATAGCAAAGAACGTCACCGTAGCTTCAACCTGC
AGTTCTTTGCGATCAGCATGCTGGATGCGTGCAGCGTGATTCTGGCGTTTATCGG
CCTGACCCGTACCACCGTAACATTAGAGCTTCGTTCTGCAACTGAGCATTCCG
ATCAACATGTTCTTTTGCTTCCTGATCCTGCGTTACCGTTATCACCTGTACAAC
ATCTGGGCGCGGTGATCATTGTGGTTACCATCGCGCTGGTTGAGATGAAGCTGAG
CTTTGAAACCCAAGAGGAAAACAGCATCATTTTCAACCTGGTGCTGATTAGCGCG
CTGATCCCGGTTTGCTTTAGCAACATGACCCGTGAGATCGTTTTCAAGAAGTACA
AGATCGACATCCTGCGTCTGAACGCGATGGTGAGCTTCTTTACAGCTGTTTACCAG
CTGCCTGATCCTGCCGGTTTACACCTGCCGTTCTGAAGCAACTGCACCTGCCG
TATAACGAGATTTGGACCAACATCAAAAACGGCTTCGCGTGCCTGTTTCTGGGTC
GTAACACCGTGTTGAAAACCTGCGGCCTGGGTATGGCGAAGCTGTGCGACGATTG
CGATGGTGCGTGGAACCTTCGCGCTGTTTAGCTTCTTTAACATTTGCGACAAC
CTGATCACCAGCTACATCATTGATAAGTTCAGCACCATGACCTATACCATTGTGA
GCTGCATCCAGGGCCCGGCGATTGCGATCGCGTACTATTTCAAATTTCTGGCGGG
TGACGTGGTTTCGTGAACCGCTCTGCTGGATTTCTGTGACCCTGTTTGGCTACCTG
TTCGGTAGCATCATTTATCGTGTGGCAACATCATTCTGGAGCGTAAGAAAATGC
GTAACGAGGAAAACGAAGACAGCGAGGGTGAACCTGACCAACGTTGATAGCATCAT
CACCCAAC

TCGAGATCGAAGGTCGTACCATACCACCATCATACCATCACCAC

```

Abb. 7.1 ORF von *opt_pfcrt* im pET-3a-Vektor. Die Sequenz wurde für *E. coli* codonoptimiert und kodiert für PfCRT^{3D7}. Der Abschnitt, der für die Faktor-Xa-Erkennungssequenz sowie einen His₁₀-tag kodiert, ist durch eine blaue beziehungsweise eine orange Farbmarkierung hervorgehoben.

ATGTACCCATACGACGTTCTGACTACGCGGACACTAGT

ATGAAATTCGCGAGCAAGAAGAATAATCAGAAGAACAGCAGCAAGAACGATGAAC
GCTACCGTGAACCTGGATAACCTGGTGCAAGAAGGCAACGGTTCTAGACTGGGTGG
CGGTAGCTGCCTGGGCAAGTGCGCGCACGTGTTCAAACCTGATCTTCAAGGAGATC
AAGGACAACATCTTCATCTACATCCTGAGCATCATCTACCTGAGCGTGTGCGTTA
TAGAGACGATTTTCGCGAAACGTACCCTGAACAAGATCGGTAACCTACAGCTTTGT
GACCAGCGAAACCCACAACCTTCATTTGCATGATCATGTTCTTTATCGTTTACAGC
CTGTTTCGGCAACAAGAAAGGTAATAGCAAAGAACGTCACCGTAGCTTCAACCTGC
AGTTCTTTGCGATCAGCATGCTGGATGCGTGCAGCGTGATTCTGGCGTTTATCGG
CCTGACCCGTACCACCGGTAACATTCAGAGCTTCGTTCTGCAACTGAGCATTCCG
ATCAACATGTTCTTTTGCTTCCTGATCCTGCGTTACCGTTATCACCTGTACAACT
ATCTGGGCGCGGTGATCATTGTGGTTACCATCGCGCTGGTTGAGATGAAGCTGAG
CTTTGAAACCCAAGAGGAAAACAGCATCATTTTCAACCTGGTGCTGATTAGCTCG
CTGATCCCGGTTTGCTTTAGCAACATGACCCGTGAGATCGTTTCAAGAAGTACA
AGATCGACATCCTGCGTCTGAACGCGATGGTGAGCTTCTTTCAGCTGTTTACCAG
CTGCCTGATCCTGCCGTTTACACCCTGCCGTTCTGAAGGAACTGCACCTGCCG
TATAACGAGATTTGGACCAACATCAAAAACGGCTTCGCGTGCCTGTTTCTGGGTCT
GTAACACCGTGTTGAAAACCTGCGGCCTGGGTATGGCGAAGCTGTGCGACGATTG
CGATGGTGCGTGGAACCTTCGCGCTGTTAGCTTCTTTAGCATTTGCGACAAC
CTGATCACCAGCTACATCATTGATAAGTTCAGCACCATGACCTATACCATTGTGA
GCTGCATCCAGGGCCCGGCGACTGCGATCGCGTACTATTTCAAATTTCTGGCGGG
TGACGTGGTTATTGAACCGCTCTGCTGGATTTCTGACCTGTTTGGCTACCTG
TTCGGTAGCATCATTTATCGTGTGGCAACATCATTCTGGAGCGTAAGAAAATGC
GTAACGAGGAAAACGAAGACAGCGAGGGTGAACCTGACCAACGTTGATAGCATCAT
CACCCAACCTCGAG

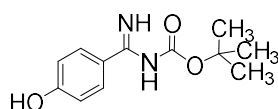
ATCGAGGGAAGGTCGAGCACCACCACCACCACCACCATCATCATCAT

Abb. 7.2 ORF von *pfcrf* (*Dd2*) im pDRTXa-Vektor. Diese Sequenz kodiert für PfCRT^{Dd2}. Die mutierten Tripletts sind unterstrichen. Der Abschnitt, der für einen HA-tag, die Faktor-Xa-Erkennungssequenz sowie einen His₁₀-tag kodiert, ist durch eine grüne, blaue beziehungsweise eine orange Farbmarkierung hervorgehoben.

7.2 Synthese und Analytik von Pentamidin-Biotin

Pentamidin-Biotin **9** wurde von B. Henke (Pharmazeutisches Institut, CAU, Kiel) synthetisiert. Zwischenprodukte wurden von ihm dabei mit einem Mitteldruckflüssigchromatographie-System von *Labomatic Instruments* gereinigt. Die Trennung erfolgte an Kieselgel 60 (40-63 μm) bei einem Druck von 4-4,5 bar und einer Detektionswellenlänge von 254 nm. Die Fließmittel sind im Folgenden angegeben.

I. Schritt (Ihori *et al.*, 2015; WO/2015/087857)

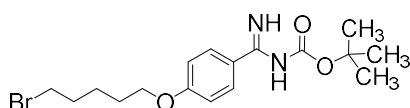


2; C₁₂H₁₆N₂O₃ (236,3 g mol⁻¹)

Ausbeute: 0,88 g (3,32 mmol), 64 %

4-Hydroxybenzamidin-hydrochlorid (**1**) (1,00 g; 5,79 mmol), Triethylamin (1,76 ml; 12,7 mmol) und Di-*tert*-butyldicarbonat (2,78 g; 12,7 mmol) wurden in 14 ml Dimethylformamid (DMF) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 40 ml demineralisiertes Wasser hinzugefügt. Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert. Der Rückstand wurde durch Rühren über Nacht in 25 ml Ethanol und 10 ml 10%iger NaOH gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser und Ethylacetat aufgenommen, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Aus den vereinten organischen Extrakten wurden nach Trocknung über Natriumsulfat und der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum das Produkt in farbloser, kristalliner Form erhalten.

II. Schritt Patent: (Ihori *et al.*, 2015; WO/2015/087857)



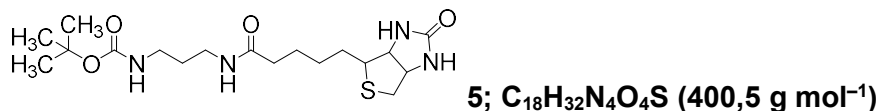
3; C₁₇H₂₅BrN₂O₃ (385,3 g mol⁻¹)

Ausbeute: 0,67 g (1,74 mmol), 47 %

Das Boc-geschützte Amidin **2** (0,880 g; 3,7 mmol) wurde in 12 ml Acetonitril gelöst und mit Kaliumcarbonat (0,52 g; 3,7 mmol) versetzt. Nach 0,5 h wurden 1,4-Dibrombutan (4,3 g; 18,7 mmol) hinzugefügt. Nach 4 h Erhitzen unter Rückfluss wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Wasser versetzt. Nach Zugabe von Ethylacetat und einer Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde die organische Phase wie zuvor beschrieben, über Na₂SO₄ getrocknet und mittels Rotationsverdampfer entfernt.

Das Produkt wurde mittels Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) an Kieselgel gereinigt (Fließmittel Dichlormethan, Methanol; 99:1). Es wurde ein farbloses, kristallines Produkt erhalten.

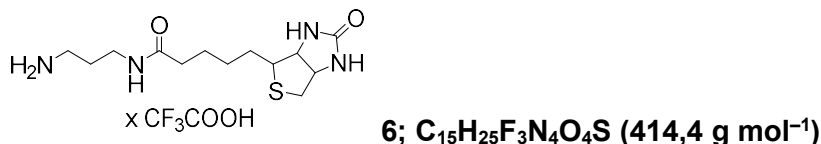
III. Schritt



Ausbeute: 0,84 g (2,10 mmol), 78 %

N-Boc-1,4-propandiamin (0,47 g; 2,7 mmol) wurden in 20 ml DMF gelöst und mit Triethylamin (0,45 ml; 3,25 mmol) versetzt. Nach 0,5 h wurde (+)-Biotin-*N*-succinimidylester (**4**) (1,10 g; 3,2 mmol) hinzugefügt und der Ansatz wurde für weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Vakuum wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (MPLC) an Kieselgel gereinigt (Fließmittel: Dichlormethan, Methanol; 80:20). Es wurde ein farbloses, kristallines Produkt erhalten.

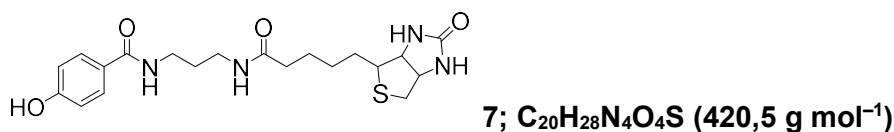
IV. Schritt



Ausbeute: 0,82 g (1,98 mmol), 99 %

Das im dritten Schritt dargestellte Amid **5** (0,79 g; 2,0 mmol) wurde in 16 ml Dichlormethan gelöst. Nach Abkühlen in einem Eisbad wurden 8 ml Trifluoressigsäure hinzugefügt und der Ansatz weiter gerührt. Nach 0,5 h wurde das Eisbad entfernt und bis zum Erreichen der Raumtemperatur weiter gerührt. Im Vakuum wurde das Lösungsmittel entfernt. Dabei wurde ein gelbes Öl erhalten.

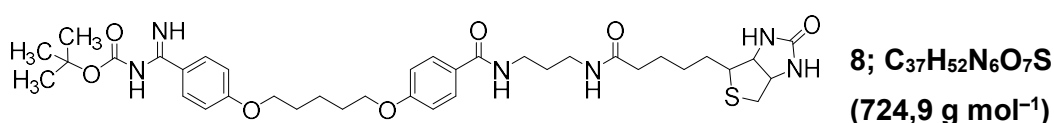
V. Schritt



Ausbeute: 0,34 g (0,81 mmol), 41 %

Das im vierten Schritt entschützte Amin **6** (0,82 g; 2,0 mmol) wurde in 5 ml DMF gelöst, mit *N,N*-Diisopropylethylamin (0,65 g; 5,0 mmol) versetzt und für 10 min gerührt. Anschließend erfolgte die Umsetzung mit 4-Hydroxybenzimidssäureethylesterhydrochlorid (0,40 g; 2,0 mmol), die nach 3 h durch Zugabe von Essigsäure (0,60 g; 10 mmol) gestoppt wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (MPLC) an Kieselgel gereinigt (Fließmittel: Dichlormethan, Methanol; 95:5). Es wurden farblose Kristalle erhalten.

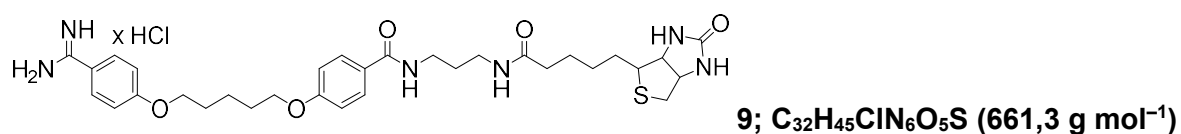
VI. Schritt



Ausbeute: 0,44 g (0,61 mmol), 86 %

Das im fünften Schritt erhaltene Amid **7** (0,29 g; 0,69 mmol) wurde zusammen mit Kaliumcarbonat (97 mg; 0,70 mmol) in einer Mischung aus 5 ml Acetonitril und 1 ml DMF gelöst. Anschließend wurde der asymmetrische Ether **3** (0,32 g; 0,82 mmol) gelöst in 1 ml DMF hinzugefügt. Für die Umsetzung wurde der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der Niederschlag wurde filtriert und säulenchromatographisch (MPLC) an Kieselgel gereinigt (Fließmittel: Dichlormethan, Methanol, Triethylamin; 90:10:0,5). Es wurde ein farbloses, kristallines Produkt erhalten.

VII. Schritt



Ausbeute: 0,12 g (0,18 mmol), 30 %

Der asymmetrische Ether **8** (0,44 g; 0,61 mmol) wurde in 5 ml Methanol gelöst und in einem 25-ml-Dreihalskolben in einem Salz-Eiswasserbad auf eine Temperatur von etwa -10 °C gekühlt. Anschließend wurde langsam HCl-Gas bis zur Sättigung in die Lösung eingeleitet. Die Temperatur durfte hierbei nicht über 5 °C steigen. Im Anschluss wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Es wurden farblose Kristalle erhalten.

¹H-NMR-Spektroskopie

Eine Analyse von Pentamidin-Biotin **9** mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie (MS) wurde von B. Henke in Auftrag gegeben. Das ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 7.3) wurde mit dem Kernresonanzspektrometer *Bruker Avance III 300* bei einer Messfrequenz von 300 MHz und einer Temperatur von 298 K aufgezeichnet und mit der Software *Bruker Topspin 2.1* prozessiert. Die chemische Verschiebung δ in ppm (*parts per million*) ist relativ zu d₅-DMSO in dem deuterierten Lösungsmittel d₆-DMSO angegeben.

Die Zuordnung der Signale zu den H-Atomen in der Verbindung erfolgte nach dem in Abb. 7.3 angegebenen Nummerierungsschema. Einige Signale überlagerten sich, soweit möglich wurden die Kopplungskonstanten angegeben. Unter Berücksichtigung eines ¹H-NMR-Spektrums für (+)-Biotin aus der Literatur (Crisp & Jiang, 2001) ließen sich die Signale plausibel den H-Atomen zuordnen.

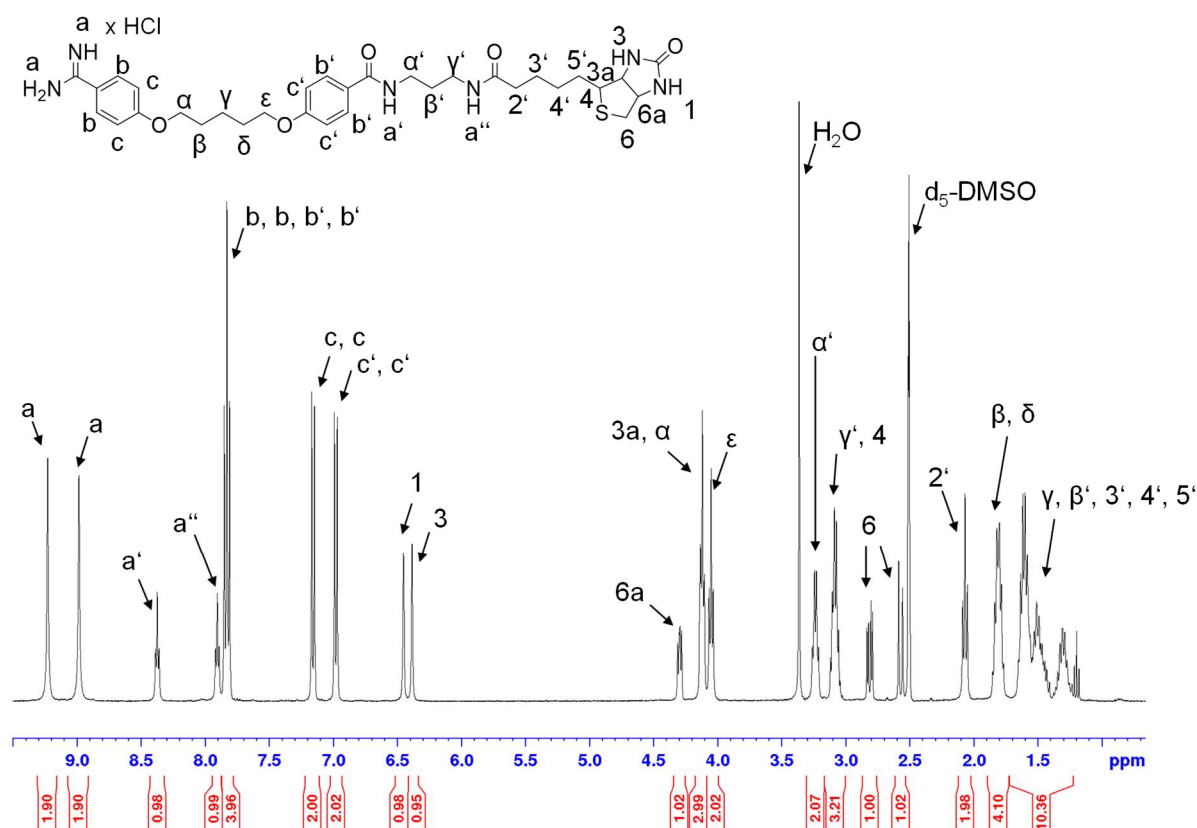


Abb. 7.3 ¹H-NMR-Spektrum von Pentamidin-Biotin (Messfrequenz: 300 MHz, 25 °C, d₆-DMSO). Entsprechend des angegebenen Nummerierungsschemas sind die Signale den H-Atomen im Molekül zugeordnet. Das Peakintegral, entsprechend der Anzahl der H-Atome, ist in rot unterhalb der ppm-Skala angegeben. Da Pentamidin-Biotin als Hydrochlorid vermessen wurde, liegt die Amidinfunktion protoniert vor.

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, d₆-DMSO):

δ /ppm = 9,22 (s, 2 H), 8,98 (s, 2 H), 8,37 (t, 1 H, $J^3 = 5,67$ Hz), 7,90 (t, 1 H, $J^3 = 5,74$ Hz), 7,83 (m, 4 H, Teil eines AA'XX'-Systems), 7,15 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems), 6,97 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems), 6,45 (s, 1 H), 6,38 (s, 1 H), 4,29 (m, 1 H), 4,11 (m, 3 H), 4,04 (t, 2 H, $J^3 = 6,28$ Hz), 3,23 (q, 2 H, $J^3 = 6,43$ Hz), 3,08 (m, 3 H), 2,81 (dd, 1 H, $J^3 = 5,05$ Hz, $J^3 = 12,4$ Hz), 2,56 (d, 1 H, $J^3 = 12,40$ Hz), 2,06 (t, 2 H, $J^3 = 7,35$ Hz), 1,76-1,85 (m, 4 H), 1,23-1,66 (m, 10 H)

Massenspektrometrie

Mit einer Elektrospray-Ionisation (ESI) wurde das Massenspektrum von Pentamidin-Biotin **9** mit dem *Bruker Amazon SL* Ionenfallen-Massenspektrometer aufgenommen. Zum Probeneinlass war das Hochdruckflüssigchromatographie-System *Agilent 1260* vorgeschaltet. Die Elutionsparameter lauten wie folgt: Eluent A: 0,1%ige Essigsäure in destilliertem Wasser; Eluent B: Acetonitril; Gradient: 0-2,5 min (97 % A, 3 % B), 2,5-5,5 min (95 % A, 5 % B), 5,5-10 min (35 % A, 65 % B), 10-11 min (100 % B). Die Datenprozessierung erfolgte mit der Software *Bruker Data Analysis 4.0*.

***m/z* (%): 625,2 [M+H]⁺ (100)**

Ein Masse-Ladungsverhältnis von 625,2 kann einem Moleküllionenaddukt [M+H]⁺ von Pentamidin-Biotin **9** zugeordnet werden, da sich die Molekülmasse um die des Hydrochlorids reduziert, da nur Kationen zum Analysator geleitet werden.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation abgesehen von der Beratung durch den Betreuer nur mit den hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln selbstständig verfasst habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich versichere des Weiteren, dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde. Diese Arbeit wurde noch in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt und ist in Teilen bereits veröffentlicht worden:

Publikation:

Petersen, L.M., Beitz, E. The ionophores CCCP and gramicidin but not nigericin inhibit *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporins at neutral pH. *Cells* **2020**, 9, 2335

Posterbeitrag:

Petersen, L.M., Beitz, E. Large-scale cell-free production and purification of the *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter (PfCRT). 8th Congress of European Microbiologists **2019**, Glasgow, Schottland



Lea Madlen Petersen

Kiel, 04.06.2021

Danksagung

Ich bedanke mich bei Eric Beitz, unter dessen Betreuung die vorliegende Arbeit am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt worden ist, für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit, die stets offene Tür sowie die Ermöglichung der wissenschaftlichen Vernetzung und des Austauschs sowohl vor Ort in Kiel als auch in Italien und Schottland. Ich danke auch meinen Kooperationspartnern für ihre wertvollen Beiträge zu dieser Arbeit: Philipp Arnold, Arne Möller, David Horn, Joana Faria. Für die hervorragende technische Unterstützung im Laboralltag bedanke ich mich bei Anna Fuchs und Björn Henke sowie für ihren unterstützenden Beitrag bei den studentischen Hilfskräften und Wahlpflichtfächler*innen. Mein Dank gilt auch dem Institut für Klinische Molekularbiologie in Kiel und seinem technischen Team (T. Naujoks und C. Noack) für die Sanger-Sequenzierung. Für schnelle Reparaturen und Problemlösungen bedanke ich mich bei Kalle Bock und Dirk Böhme aus der Werkstatt-Abteilung, bei Detlef Rödiger und Volkmar Kleppa von der IT sowie bei Susanne Voss und Britta von der Heydt für ihre organisatorische Arbeit im Hintergrund. Danke Ulrich Girreser, Björn Henke, Susan Häuer und Larissa Einfeldt für euren Einsatz und eure Unterstützung rund um das 4.-Semester-Praktikum. Uli, ich danke dir ganz besonders für die NMR-Nachhilfestunde!

An alle ehemaligen und aktuellen Mitglieder des Arbeitskreises: In eurer geborgenen, inspirierenden und musikalisch untermalten Arbeitsatmosphäre habe ich sehr gerne gearbeitet. Für den fachlichen und anregenden Austausch in der ersten Phase danke ich insbesondere Folkand Helmstetter, Philipp Hajek, Malte Mäder und Holger Erler. Danke an Bastian Höger: Basti, ohne dich hätte ich die S30-Extrakt-Präparationen nicht geschafft. Du und „das Team“ habt zudem die langen Tage und Nächte der S30-Extraktpräparation viel angenehmer gestaltet. Philipp Walloch und Katharina Geistlinger danke ich für die kurze, aber schöne Zeit bei *Walloch, Petersen & Geistlinger* und, dass ihr mit mir auch alle meine grünen Freunde im Büro willkommen geheißen habt. Spontane und geplante Zusammenkünfte mit Freund*innen und Kolleg*innen vom Institut haben auch die Zeit nach der Arbeit bereichert, insbesondere danke ich Anna-Lena Köpnick, Jana Schmidt und Katha – auch für die mentale Unterstützung in allen Lebenslagen.

Bei Jana, Katha und meiner Schwester möchte ich mich für eure Beiträge und eure Gewissenhaftigkeit beim Korrekturlesen der gesamten Arbeit sowie bei Sven Herschel beim chemischen Teil bedanken.

Mein Dank für die motivierenden Worte während der Promotion und beim Anfertigen dieser Arbeit gilt meiner Familie, insbesondere meiner großartigen Schwester, die alle Höhen und Tiefen der Promotion mit mir durchlebt hat. Du hast etwas gut bei mir!